

Fabio Carneiro Sterzelecki

**Exigência de proteína e da relação carboidrato/lipídio na dieta de juvenis da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879)**

Tese submetida ao Programa de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Aquicultura.

Orientador: Vinícius Ronzani Cerqueira

Coorientadora: Débora Machado Fracalossi.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sterzelecki, Fabio Carneiro

Exigência de proteína, carboidrato e lipídio na dieta de juvenis da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher, 1879) / Fabio Carneiro Sterzelecki ; orientador, Vinícius Ronzani Cerqueira ; coorientadora, Débora Machado Fracalossi. - Florianópolis, SC, 2016.  
88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Isca-viva. 3. Sardinha-verdadeira. 4. Nutrição. 5. Enzima Digestiva. I. Cerqueira, Vinícius Ronzani . II. Fracalossi, Débora Machado. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Exigência de proteína e relação carboidrato/lipídio na dieta de juvenis da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879)**


Por

FABIO CARNEIRO STERZELECKI

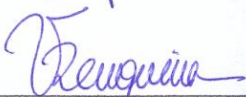
Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

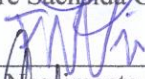
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

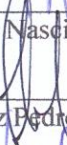
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira – *Orientador*

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eyoy Zaniboni Filho - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alexandre Sachida Garcia - UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Luiz Pedreira Mourão - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ronaldo Olivera Cavalli - UFRPE



Este trabalho é dedicado aos meus  
professores, amigos e minha família.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Professor Vinicius Ronzani Cerqueira pelas orientações, paciência com a minha pessoa e confiança no trabalho ao longo desses anos. A minha coorientadora Débora Machado Fracalossi, pelos valiosos ensinamentos e apoio na nutrição, peça chave no presente estudo.

Aos professores do programa de Aquicultura, em especial Juliet K. Sugai pelos profundos ensinamentos e colaboração na bioquímica e enzimologia.

Ao Hilton Hiroshi Oshima da Cargill Nutrição Animal, Jacó do LABCAI, Fernando, Lula, Maria Fernanda e estagiários do LABNUTRI pelo grande suporte técnico.

Aos amigos e colegas da Estação de Maricultura Elpídio Beltrame pelos momentos memoráveis e suporte durante a realização dos trabalhos, e em especial, a todos que tiveram uma rápida ou longa passagem e convivência aos redores do LAPMAR e LAPOM.

Ao CNPQ e CAPES, que financiaram os recursos necessários ao desenvolvimento dos trabalhos.

E finalmente a minha família, pela compreensão de minha ausência durante esses anos, pois como todos sabem, os peixes não vivem só de amor.





## RESUMO

A utilização do juvenil de sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, como isca-viva na captura do bonito-listrado, *Katsuwonus pelamis*, apresenta um grande impacto no seu estoque já sobre-explorado. Portanto o presente trabalho contribuiu para a produção de isca-viva em cativeiro determinando a exigência de proteína e da relação lipídio/carboidrato na dieta de juvenis de sardinha-verdadeira. A exigência em proteína foi definida em  $367,7 \text{ g.kg}^{-1}$ , após um experimento de seis semanas com a utilização de seis dietas contendo níveis crescentes de proteína (250 a  $500 \text{ g.kg}^{-1}$ ). A sobrevivência foi acima de 98% em todos os tratamentos, mostrando ser uma espécie que se adapta bem a diferentes níveis na ração. Entretanto, quanto maior foi a ingestão proteica, menor foi a retenção no organismo, o que indica o gasto em energia. As enzimas digestivas protease alcalina e amilase responderam às dietas, coincidindo a atividade máxima (350 e  $400 \text{ g.kg}^{-1}$ , respectivamente) com o maior crescimento. O segundo experimento determinou a proporção de carboidrato e lipídio (CHO/L) necessária na dieta com fins energéticos para melhorar a utilização de proteína para o crescimento. Após 32 dias de alimentação com as proporções CHO/L de 2, 3, 4, 5, 6 e 7, o crescimento do juvenil da sardinha-verdadeira foi significativamente maior quando alimentado com a proporção de CHO/L de 3,41, o que corresponde aproximadamente a  $300 \text{ g.kg}^{-1}$  de carboidrato e  $88 \text{ g.kg}^{-1}$  de lipídio. Enquanto algumas espécies possuem dificuldade para utilizar grandes quantidades de energia de origem não proteica, os juvenis de sardinha-verdadeira apresentaram boa adaptação, tendo em vista a sobrevivência acima de 97 % e a homeostasia dos metabólitos sanguíneos, após 18 horas da última alimentação. As enzimas digestivas novamente responderam aos diferentes níveis de nutrientes encontrados na dieta. Dessa vez, a atividade da lipase e da amilase responderam positivamente ao incremento de lipídio e carboidrato na ração, respectivamente, correspondendo o máximo da atividade ao máximo do crescimento do peixe. Portanto, ficou demonstrado que a exigência dos juvenis de sardinha-verdadeira para proteína, e da relação carboidrato/lipídio é de 367,7, 300 e  $88 \text{ g.kg}^{-1}$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Isca-viva. Sardinha-verdadeira. Nutrição. Enzima digestiva.



## ABSTRACT

The live bait use for capturing the skipjack *Katsuwomus pelamis* represents a great impact on overexploited stock of Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis*. Therefore, the present study provided support to the live bait production of Brazilian sardine in captivity, determining its dietary protein and lipid/carbohydrate ratio requirement. First, the most expensive nutrient, protein, was determined in  $367.7 \text{ g.kg}^{-1}$ , after a six-week experiment using six diets with increasing protein content ( $255 - 500 \text{ g.kg}^{-1}$ ). The survival was over 98% among treatments, showing to be a species that adapts to different protein levels. Nevertheless, the higher was protein intake, the lower was the protein retention, which indicates a preference in energy expenses. The digestive enzymes alkaline protease and amylase responded to the feed content, corroborating the maximum activity to the higher growth. The second experiment determined the dietary carbohydrate to lipid ratio (CHO/L) necessary to improve protein utilization to growth. After 32 days feeding with 2, 3, 4, 5, 6 and 7 CHO/L ratio, the juvenile growth was significantly higher when fed to 3.41 CHO/L ratio, which correspond to approximately  $300 \text{ g.kg}^{-1}$  and  $88 \text{ g.kg}^{-1}$  of carbohydrate and lipid, respectively. While some species are not capable of using great quantity of non-protein energy, Brazilian sardine juvenile showed to be well adapted, considering the survival above 97% and the established blood metabolite homeostasis after 18 hours of the last feeding. The digestive enzymes responded again to the different dietary nutrient level. At this time, lipase and amylase activities responded positively to lipid and carbohydrate inclusion in diet, corroborating the higher activity level to higher growth. Therefore, the present study showed that in these conditions and stage, Brazilian sardine juvenile requires  $367.7$ ,  $300$  and  $88 \text{ g.kg}^{-1}$  of dietary protein, carbohydrate/lipid ratio, respectively.

**Keywords:** Aquaculture. Live bait. True sardine. Nutrition. Digestive enzyme.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Regressão polinomial do ganho de peso da sardinha-verdadeira alimentada com concentrações crescentes de proteína durante seis semanas. Os dados são apresentados como média e desvio padrão ( $p < 0,05$ )..... 40
- Figura 2.** Atividade da protease ácida, alcalina, lipase e amilase no trato gastrointestinal de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes níveis de proteína durante seis meses. Os dados são mostrados como média  $\pm$  média do erro padrão ( $n=6$ ). U representa  $\mu\text{mol}$  do produto formado  $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , exceto para protease alcalina que representa a diferença de absorbância em  $366 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Médias com diferentes letras apresentam diferenças significativas..... 41
- Figura 3.** Regressão segmentada baseada no ganho de peso da sardinha-verdadeira alimentada com diferentes taxas de CHO/L por 32 dias. Os dados são mostrados como media e erro padrão. .... 62
- Figura 4.** Atividade da protease ácida, alcalina, amilase, e lipase no trato gastrointestinal da sardinha-verdadeira alimentada com diferentes relações de CHO/L durante 32 dias. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )..... 64



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos ingredientes e análise centesimal das dietas experimentais (matéria seca).....	35
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros de crescimento e de alimentação dos juvenis de sardinha-verdadeira tratados com seis dietas experimentais durante seis semanas.....	39
<b>Tabela 3.</b> Composição centesimal (peso úmido $\text{g.kg}^{-1}$ ) da sardinha-verdadeira alimentada com as dietas experimentais durante seis semanas. ....	40
<b>Tabela 4.</b> Formulação e composição das dietas experimentais. ....	57
<b>Tabela 5.</b> Desempenho de crescimento e utilização da ração de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com dietas de diferentes taxas de CHO/L por 32 dias. ....	61
<b>Tabela 6.</b> Composição centesimal dos juvenis de sardinha-verdadeira alimentados diferentes relações de CHO/L durante 32 dias.....	62
<b>Tabela 7.</b> Metabólitos sanguíneos da sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes relações de CHO/L durante 32 dias.....	63





## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>19</b>
<b><i>A importância da sardinha-verdadeira, <i>Sardinella brasiliensis</i>.</i></b> .....	<b>19</b>
<b><i>Exigência nutricional</i></b> .....	<b>21</b>
Exigência proteica .....	22
Relação carboidrato/lipídio .....	23
<b><i>Enzimas digestivas: ferramentas para formulação da dieta.</i></b> .....	<b>24</b>
<b><i>Justificativa</i></b> .....	<b>28</b>
<b><i>Objetivos</i></b> .....	<b>28</b>
Objetivo Geral .....	28
Objetivos Específicos .....	28
<b><i>Formatação dos artigos</i></b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>30</b>
<i>EXIGÊNCIA PROTEICA NA DIETA DE JUVENIS DE SARDINHA-VERDADEIRA, <i>Sardinella brasiliensis</i> (STEINDACHNER, 1879)</i> .....	<b>30</b>
<b><i>Resumo</i></b> .....	<b>31</b>
<b><i>Abstract</i></b> .....	<b>32</b>
<b><i>Introdução</i></b> .....	<b>33</b>
<b><i>Materiais e métodos</i></b> .....	<b>34</b>
Dieta experimental .....	34
Procedimentos experimentais.....	34
Análise de composição centesimal .....	36
Ensaio enzimático .....	36
Análise estatística .....	38
<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>38</b>
<b><i>Discussão</i></b> .....	<b>41</b>
<b><i>Agradecimentos</i></b> .....	<b>44</b>
<b><i>Referências</i></b> .....	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>51</b>
<i>EXIGÊNCIA DA RELAÇÃO CARBOIDRATO/LIPÍDIO DA DIETA DE JUVENIS DE SARDINHA-VERDADEIRA, <i>Sardinella brasiliensis</i> (STEINDACHNER, 1879)</i> .....	<b>51</b>

<b>Resumo</b> .....	52
<b>Abstract</b> .....	53
<b>Introdução</b> .....	54
<b>Materiais e métodos</b> .....	56
Desenho experimental.....	56
Formulação das dietas .....	56
Amostragem.....	58
Análise de metabólitos sanguíneos .....	58
Composição centesimal .....	59
Ensaio das enzimas digestivas.....	59
Cálculos e análise estatística .....	60
<b>Resultados</b> .....	61
Sobrevivência, crescimento e utilização das dietas .....	61
Composição centesimal .....	62
Metabólitos sanguíneos.....	63
Enzimas digestivas.....	63
<b>Discussão</b> .....	64
<b>Agradecimentos</b> .....	67
<b>Referências</b> .....	67
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	75
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	77
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	79
<b>APÊNDICE</b> .....	87

## INTRODUÇÃO GERAL

### A importância da sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*.

O gênero *Sardinella* é amplamente distribuído ao redor do mundo, ocupando os dois lados do Oceano Atlântico e também do Indo-Pacífico. As espécies desse grupo são de grande interesse para a pesca extrativa em todo o mundo (BAKUN; PARRISH, 1990; CERGOLE; DIAS-NETO, 2011; GANIAS, 2014). No Brasil, a sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis*, é encontrada na costa sul-sudeste entre os estados do Rio de Janeiro (cabo de São Tomé, 22°S) e Santa Catarina (ao sul do cabo de Santa Marta Grande, 29°S) (JABLONSKI, 2007) e apresenta-se como principal recurso pesqueiro marinho do país, em termos de desembarque (CERGOLE; SACCARDO; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 2002). A grande procura pela sardinha-verdadeira é devida, sobretudo, à manutenção de uma importante cadeia de processamento industrial de pescado: o de conservas (enlatados) de sardinha e também a de atum (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Para capturar o atum bonito-listrado (*Katsuwonus pelamis*), a frota pesqueira brasileira utiliza, principalmente, o juvenil de sardinha-verdadeira como isca-viva (OCCHIALINI, 2013). Portanto, o sucesso da indústria enlatadora depende basicamente da captura do juvenil e do adulto de uma única espécie. Contudo, a atividade encontra-se ameaçada devido à sobre-exploração do estoque de sardinha-verdadeira (FAO, 2016; SANTOS; RODRIGUES-RIBEIRO, 2000).

A produção da sardinha-verdadeira declinou nos últimos 40 anos devido a efeitos ambientais e à sobrepesca (JABLONSKI, 2007). Segundo o boletim estatístico do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2012), a sardinha-verdadeira apresentou o maior volume de captura entre os peixes marinhos em 2010, com 62.134 t, mas sofreu um decréscimo de 25,4% em relação a 2009, quando foram produzidas 83.286 t. Em Santa Catarina, a queda da pesca extrativa de sardinha-verdadeira foi ainda maior em 2010, quando sofreu um declínio de 50% em relação ao ano anterior. Frente à baixa produção pesqueira e oferta instável de sardinha-verdadeira ao mercado, a indústria brasileira tem frequentemente importado o produto congelado (DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010). Em 2010, a importação de sardinhas congeladas do Marrocos somou 31.711.464 kg com o custo de USD 30.032.683 (MPA, 2012). Contudo, as importações são realizadas de acordo com previsões da produção nacional, e quando subestimadas,

tendem a gerar crises entre o setor produtivo e as indústrias enlatadoras (DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010).

Além do grande impacto direto da pesca sobre o estoque adulto de sardinha-verdadeira, existe uma forte pressão também com a captura de juvenis. Na temporada de 2010-2011 da pesca do bonito-listrado no sudeste brasileiro, por exemplo, foram capturados 733 milhões de juvenis de sardinha-verdadeira, o que conforme estimativas corresponderia a uma subtração de cerca de 31.000 toneladas do estoque adulto (OCCHIALINI, 2013), ou seja, quase metade da produção total em 2011 (MPA, 2012).

Nesse contexto, a aquicultura apresenta-se como a melhor alternativa para atender à expressiva demanda da indústria de enlatados, através de uma produção totalmente brasileira. Do ponto de vista ecológico, acredita-se que a aquicultura pode aliviar a pressão sobre os estoques que estão sofrendo com a sobre-exploração (NAYLOR *et al.*, 2009). Assim, um grupo de estudo composto por pesquisadores de órgãos governamentais e não-governamentais elaborou um plano para a gestão para o uso sustentável do estoque da sardinha-verdadeira, e dentre as medidas de proteção, está a utilização de isca-viva criada em cativeiro para a captura do atum (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Contudo, tecnologias de criação desta espécie ainda precisam ser desenvolvidas.

Poucas pesquisas foram realizadas para desenvolver a criação intensiva de sardinha-verdadeira. A maior parte dos estudos realizados focou a pesca (ALMEIDA; ANDRADE, 2002; DALLAGNOLO; SCHWINGEL; PEREZ, 2010; SANTOS; RODRIGUES-RIBEIRO, 2000), ecologia (ALMEIDA; ANDRADE, 2002; BAKUN; PARRISH, 1990; BRAGA, 1987; GIGLIOTTI *et al.*, 2010; MATSUURA, 1998) e a biologia (FIGUEIREDO; SALLES; RABELO, 2010; GARCIA; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2015) dessa espécie. Os poucos experimentos que a cultivaram em laboratório não tinham como objetivo a produção intensiva. Por exemplo, Rossi-Wongtschowski *et al.* (2003) coletaram ovos de sardinha-verdadeira e cultivaram as larvas para verificar a relação do crescimento com o incremento no otólito.

Os estudos preliminares em cativeiro apontam um grande potencial para a produção da sardinha-verdadeira. É uma espécie com ciclo de vida curto, alta taxa de crescimento e fecundidade (PERIN; VAZ-DOS-SANTOS, 2014). Os juvenis com 45 dias podem atingir 40 mm de comprimento (YONEDA, 1987).

Assim, em 2009, em parceria com a UNIVALI e o CEPESUL (Itajaí) foi iniciado o projeto “Isca Viva” no Laboratório de Piscicultura

Marinha, da Universidade Federal de Santa Catarina, com o objetivo de desenvolver tecnologias de criação para a sardinha-verdadeira.

Inicialmente, foi verificada a capacidade de adaptação de indivíduos adultos selvagens em cativeiro para o início da reprodução. Após 40 dias a captura no meio ambiente, foi observada a maturação gonadal em um nível que permitia a indução através de hormônios (PEREIRA, 2010). Em um estudo seguinte foi definida a concentração de  $75 \mu\text{g.kg}^{-1}$  do hormônio liberador de hormônio luteinizante análogo (LHRHa) como a melhor para a desova em confinamento, pois proporcionou maior taxa de fertilização (92 %), além de alcançar melhor sobrevivência (35%) na produção dos juvenis no fim de 24 dias de larvicultura (REIS DA SILVA, 2013). Em outro experimento foi determinado as concentrações ideais de três anestésicos para os juvenis e adultos de sardinha-verdadeira, sendo  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  de eugenol,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de MS-222 para ambos tamanhos e a concentração de  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de benzocaína para juvenis e  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  para adultos (TAKEUCHI, 2012). Em um estudo recente, foi definida a frequência alimentar de pelo menos duas vezes ao dia até a saciedade para se obter o maior crescimento de juvenis com o uso de ração comercial (BALOI *et al.*, 2014). Contudo, até o presente momento estudos sobre a nutrição da espécie não haviam sido abordados.

### **Exigência nutricional**

Similar à pecuária, a nutrição na aquicultura é uma peça chave por influenciar o crescimento do peixe, saúde, qualidade do produto e a geração de poluentes. Muitas vezes, a alimentação em empreendimentos aquícolas representa 50% dos custos variáveis, o que impacta o retorno econômico. O desenvolvimento nutricional de dietas com custo benefício ideal depende do conhecimento da exigência nutricional da espécie e da formulação de dietas balanceadas, além da adoção de apropriadas práticas de alimentação (NRC, 2011).

De maneira geral, podem ser observados determinados padrões na exigência de nutrientes dos peixes, como por exemplo, nas espécies carnívoras e onívoras, marinhas e de água doce e nas de águas quentes e frias (LOVELL, 1993). A sardinha-verdadeira é uma espécie marinha onívora, alimentando-se de fito e zooplâncton ao longo de todo o seu ciclo de vida (KURTZ; MATSUURA, 2001; SCHWARTZLOSEI, 1999).

## Exigência proteica

Todos os nutrientes essenciais para a dieta de animais terrestres, também são importantes para os peixes (LALL; TIBBETTS, 2009). Dentre os macros e micronutrientes que podemos encontrar em uma dieta completa, a proteína é o mais caro, além de apresentar um papel central em diversas funções biológicas, que pode ser estrutural, enzimática, transportadora, contrátil, imunológica e reguladora. Existe também uma estreita relação entre o ganho de biomassa dos peixes e a deposição de proteína nos tecidos (NRC, 2011). Portanto, a determinação da quantidade necessária na dieta de novas espécies na piscicultura é importante para o desenvolvimento do peixe e para a viabilidade econômica da produção.

A exigência proteica de um peixe pode ser entendida como a menor quantidade necessária para atender à exigência de aminoácidos do organismo e para alcançar o maior crescimento (LOVELL, 1993). Dietas com nível proteico maior que o necessário para atender à demanda do organismo promovem a lise de aminoácidos que serão posteriormente excretados no ambiente através das brânquias e urina (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Carvalho *et al.* (2010), por exemplo, observaram aumento de amônia pós-prandial diretamente proporcional à concentração proteica na dieta da tainha *Mugil liza*. Já outros estudos mostram que a ingestão de proteína menor que o exigido pode afetar o crescimento (DENG *et al.*, 2011; EL-DAKAR; SHALABY; SAOUD, 2011) e a atividade celular (KIRON, 2012). Assim, da mesma maneira que o excesso na ração é economicamente e ambientalmente indesejável, a deficiência de proteína na ração pode diminuir o crescimento, a sobrevivência dos peixes e os rendimentos com a produção (LALL; TIBBETTS, 2009).

A concentração proteica ótima da dieta depende da espécie em estudo, do estágio de desenvolvimento, temperatura da água, energia e qualidade da proteína (KUMAR *et al.*, 2013). Em geral, os peixes herbívoros e onívoros necessitam de 25% a 35% de proteína em sua dieta, enquanto que os carnívoros de 40% a 55%. Essa diferença deve-se ao fato dos peixes carnívoros possuírem um limitado uso de carboidratos como fonte energética (LALL; TIBBETTS, 2009). Como exemplo, as espécies carnívoras de linguado *Paralichthys olivaceus* (LEE; PARK; BANG, 2002) e garoupa *Epinephelus coioides* (LUO *et al.*, 2004) necessitam, respectivamente, de 45% e 48% de proteína bruta (PB) para atingir o maior crescimento, enquanto que as onívoras jundiá *Rhamdia quelen* (MEYER; FRACALLOSSI, 2004) e a carpa *Spinibarbus hollandi*

(YANG *et al.*, 2003) precisam de 33 a 37% e 33% de PB, respectivamente.

### Relação carboidrato/lipídio

A utilização ótima de proteína está relacionada não só a sua concentração na dieta, mas também com a disponibilidade de energia (WATANABE, 1982). O excesso de energia em uma dieta pode limitar a ingestão de alimento, disponibilizando menos proteína do que o necessário ao organismo. Já o contrário, em dietas com alta relação proteína/energia, há preferencialmente a lise do excesso proteico para obtenção de energia (MEYER; FRACALOSSI, 2004).

Outro fator não menos importante e que é frequentemente ignorado nos estudos é sobre a fonte de energia contida na ração (GLENCROSS *et al.*, 2014). Os nutrientes da alimentação que contribuem significativamente para o suprimento de energia do animal podem ser categorizados em três classes de compostos: proteínas, lipídios e carboidratos (BUREAU *et al.*, 2000). O uso de proteína como fonte de energia pelo animal é indesejável, por causa do alto custo desse nutriente em relação aos outros e devido à maior liberação de compostos nitrogenados no ambiente, associado ao catabolismo do aminoácido (NRC, 2011). Assim, as fontes não proteicas, carboidratos e lipídios, são comumente incorporadas na dieta para maximizar o uso de proteína para o crescimento (LI *et al.*, 2012). Em geral, o aumento do conteúdo lipídico da dieta pode ajudar a reduzir o catabolismo de proteína em várias espécies, mas em excesso, pode prejudicar o crescimento do peixe (GAO *et al.*, 2010) e a saúde do animal (LI *et al.*, 2012). Outro fator que afeta o uso desse nutriente em larga escala é a baixa disponibilidade e o alto valor do óleo de peixe, principal fonte lipídica presente nas rações de peixes (NAYLOR *et al.*, 2009).

Já os carboidratos possuem algumas vantagens como fonte energética em relação aos outros nutrientes, pois podem ser encontrados em diversos ingredientes, são disponíveis no mercado em grande quantidade e possuem baixo preço (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005). Entretanto, quando comparado com os lipídios, o uso de carboidratos como fonte de energia para diminuir o uso da proteína nos peixes, o chamado “efeito poupador de proteína”, tem recebido pouca atenção (SINGH; BALANGE; GHUGHUSKAR, 2006). Isso se deve possivelmente à baixa capacidade de algumas espécies de peixes na utilização dos carboidratos como fonte de energia (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; NRC, 2011).

Entretanto, estudos apontam que a intolerância dos peixes aos carboidratos não é evidente nos onívoros e herbívoros, e até mesmo nas espécies carnívoras, a glicose é importante para o metabolismo de tecidos específicos e/ou atividades específicas (POLAKOF *et al.*, 2012). Enquanto peixes onívoros e herbívoros são relativamente tolerantes e utilizam efetivamente uma dieta com 30-50% de carboidratos, sem efeitos negativos (POLAKOF *et al.*, 2012), o carnívoro olhete *Seriola lalandi* apresenta diminuição de performance com dietas acima de 10% (BOOTH; MOSES; ALLAN, 2013). Assim, apesar de não existir exigência para o organismo, a inclusão de carboidratos se faz indispensável nas rações comerciais do ponto de vista econômico (KAMALAM; MEDALE; PANSEERAT, 2016).

Resumindo, é preciso definir cuidadosamente a relação ótima de carboidrato e lipídio (CHO/L) na ração dos peixes. A proporção adequada pode poupar o uso de proteína como fonte de energia. Diversos estudos mostram uma variação nesta relação, sendo que as espécies onívoras e herbívoras geralmente possuem um valor mais alto de CHO/L do que as carnívoras (Quadro 1).

### **Enzimas digestivas: ferramentas para formulação da dieta.**

O trato gastrointestinal (TGI) é o primeiro órgão que possui acesso aos nutrientes da dieta, além de possuir importante papel na regulação do metabolismo dos peixes (BUDDINGTON; KROGDAHL, 2004; POLAKOF *et al.*, 2012). Na sardinha, o sistema digestório é composto pelo esôfago, seguido do estômago, intestino, cecos pilóricos e hepatopâncreas (SMICHI *et al.*, 2010). No TGI ocorre o processo de digestão do alimento, com a combinação coordenada de atividades físicas, químicas e enzimáticas para a assimilação no organismo (BAKKE; GLOVER; KROGDAHL, 2010). Nesse momento, a energia e os nutrientes dos alimentos são disponibilizados para o organismo através da quebra de polímeros em moléculas menores, que então são absorvidos através do epitélio para circulação sistêmica (BUDDINGTON; KROGDAHL, 2004).



Quadro 1. Relação ótima de carboidratos/lipídios (CHO/L) para diferentes espécies de peixes.

Espécie	Hábito alimentar	CHO/L	Peso (g)	Referências
Carpa ( <i>Megalobrama amblycephala</i> )	Herbívoro	3,58	6,61	(LI <i>et al.</i> , 2012)
Carpa capim ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )	Herbívoro	4,7	2,27	(GAO <i>et al.</i> , 2010)
Tainha ( <i>Mugiliza</i> )	Onívoro	4,9-7,71	4,6-15	(ZAMORA-SILLERO <i>et al.</i> , 2013)
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Onívoro	2,06-4,95	10,29	(ALI, A.; AL-ASGAH, 2001)
Bagre do canal ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	Onívoro	0,45-4,5	201	(GARLING JR; WILSON, 1977)
Perca ( <i>Anabas testudineus</i> )	Onívoro	0,99-3	2,15	(ALI, M. Z. <i>et al.</i> , 2012)
Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis aureus</i> )	Onívoro	6	40,9	(EL HAMMADY, 2002)
Olhete ( <i>Sciaenops ocellatus</i> )	Carnívoro	2,4	2,9	(ELLIS; REIGH, 1991)
Esturção ( <i>Huso huso</i> )	Carnívoro	1,4	760-770	(MOHSENI <i>et al.</i> , 2011)
Bagre ( <i>Leiocassis longirostris</i> )	Carnívoro	1,8	12,5	(TAN <i>et al.</i> , 2007)
Bass ( <i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i> )	Carnívoro	2,5-16,8	1,5	(NEMATIPOUR; SERRANO; GATLIN III, 1992)

O TGI não está completamente formado e funcional nos primeiros dias de vida nos peixes, mas já na primeira alimentação na maioria das espécies possui enzimas relacionadas ao metabolismo (digestão, absorção e assimilação) de moléculas como proteínas, lipídios e glicogênio. Entre as transformações que frequentemente ocorrem em muitas espécies no final do período larval, está a formação do estômago e cecos pilóricos (KOLKOVSKI, 2001). No estômago, os principais componentes secretados são o ácido clorídrico e o pepsinogênio. Os peixes parecem conter mais de uma forma de pepsinogênio, sendo que as diferentes formas mostram distintas taxas de ativação, pH ótimo, atividade específica. As pepsinas são endopeptidases, ou seja, hidrolisam ligações peptídicas a uma distância dos aminoácidos terminais, com preferência de quebra de ligações adjacentes a aminoácidos aromáticos (BAKKE; GLOVER; KROGDAHL, 2010; NRC, 2011).

Em algumas espécies de peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino (STECH; CARNEIRO; PIZAURO-JÚNIOR, 2009). As enzimas encontradas no lúmen intestinal são produzidas principalmente no pâncreas (NRC, 2011) e estão presentes desde a primeira alimentação, aumentado a secreção já nas primeiras semanas da fase larval (ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 2007). As enzimas aqui secretadas, como as proteases alcalinas, lipase e a amilase são responsáveis pela hidrólise de proteínas, lipídios e carboidratos da dieta, respectivamente (BAKKE; GLOVER; KROGDAHL, 2010).

Nos vertebrados e invertebrados, as características morfológicas e funcionais do TGI geralmente refletem a química dos alimentos, tal como o conteúdo de carboidratos, lipídios e proteínas (KARASOV; DOUGLAS, 2013).

A habilidade dos peixes em utilizar os nutrientes ingeridos depende da presença de enzimas apropriadas nos locais adequados do TGI. Normalmente, a localização e a intensidade de atividade destas enzimas variam em função do hábito alimentar e morfologia digestória (TENGJAROENKUL, 2000) sendo moduladas pela sinalização endócrina e nervosa (BUDDINGTON; KROGDAHL, 2004). Alguns pesquisadores, por exemplo, observaram que a atividade proteolítica específica é menor nas espécies herbívoras do que em onívoras e carnívoras (HOFER; SCHIEMER, 1981), embora não haja um consenso e seja considerada menos dependente do hábito alimentar que a amilase (HIDALGO; UREA; SANZ, 1999). Dessa maneira, os peixes possuem certa capacidade de adaptação de seus processos digestivos a mudanças na dieta, tais como perfil de secreção enzimática, absorção e transporte

de nutrientes (BUDDINGTON; KROGDAHL, 2004; STECH; CARNEIRO; PIZAURO-JÚNIOR, 2009).

No geral, os peixes parecem ser capazes de ajustar a secreção pancreática de acordo com o nível e qualidade do nutriente correspondente. O excesso de lipídeo, por exemplo, pode produzir efeitos negativos na atividade enzimática da lipase. Similarmente, a dieta rica em aminoácidos e proteínas, pode influenciar a secreção de enzimas proteolíticas (NRC, 2011; ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 2007). Esse fenômeno foi observado em um estudo com carpa herbívora *Labeo rohita*, no qual o aumento proteico na dieta foi seguido de um aumento da atividade da enzima digestiva proteolítica (DEBNATH *et al.*, 2007). Além disso, a fonte proteica também pode influenciar a atividade da protease. LIN e LUO (2011), por exemplo, observaram que a substituição de proteína de peixe por soja promoveu um menor índice de crescimento e atividade proteolítica das enzimas digestivas da tilápia híbrida *O. niloticus* × *O. aureus*.

Já a capacidade para digerir carboidratos difere enormemente nos peixes. Essa variabilidade reflete diferenças anatômicas e funcionais do TGI e órgãos associados. A capacidade digestiva de hidrolisar uma grande quantidade de carboidratos contida na ração é mais desenvolvida nos peixes herbívoros e onívoros, em contraste com os carnívoros (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005; RAY; GHOSH; RINGØ, 2012). Embora a única fonte endógena de amilase nos peixes sejam as células exócrinas do pâncreas, a amilase pode ser também produzida pela microbiota no intestino. A  $\alpha$ -amilase tem sido caracterizada bioquimicamente em várias espécies e clonada em algumas. Em ciprinídeos foi notada uma relação entre o hábito alimentar e atividade da amilase, com as espécies herbívoras apresentando maior atividade do que as onívoras e carnívoras. (POLAKOF *et al.*, 2012).

Resumindo, quando a composição da dieta muda, a atividade enzimática e a capacidade de absorção pode ser modulada no peixe (GARCÍA-MEILÁN *et al.*, 2013), e pode estar relacionada à maior taxa de crescimento específico do animal (THONGPRAJUKAEW *et al.*, 2011). Portanto, as enzimas digestivas podem ser consideradas ótimas ferramentas para formulação adequada da dieta, pois a atividade reflete a capacidade digestiva do organismo (HONORATO *et al.*, 2015; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; XIONG *et al.*, 2011).

## **Justificativa**

A sardinha-verdadeira é a base de um setor produtivo de grande importância econômica no Brasil, que envolve pescadores e a indústria de enlatados situados principalmente no litoral de Santa Catarina. Com a diminuição de sua produção, há a preocupação de órgãos governamentais e não governamentais para o uso sustentável do estoque. A captura de isca-viva para a pesca do bonito-listrado subtrai milhões de juvenis da natureza que poderiam aumentar o estoque adulto e a produção nacional. Além do mais, o esforço para encontrar os juvenis de sardinha-verdadeira é cada vez maior, constituindo também o principal problema para o aumento de produção de atum. Portanto a criação de isca-viva em cativeiro é uma excelente estratégia do ponto de vista ecológico e econômico.

Contudo, muitos obstáculos impedem a concretização deste projeto. Dentre eles, o principal gargalo da piscicultura marinha no Brasil é a dependência da farinha e do óleo de peixe, que são as principais fontes de proteína e ácidos graxos essenciais na alimentação dos peixes cultivados (CAVALLI; FERREIRA, 2010). Assim a determinação da exigência desses nutrientes nas espécies marinha se faz imprescindível para viabilizar a produção do ponto de vista econômico.

## **Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Determinar a exigência proteica e relação carboidrato/lipídio na dieta de juvenis de sardinha-verdadeira.

### **Objetivos Específicos**

- a) Verificar os índices zootécnicos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com seis dietas isoenergéticas contendo 250, 300, 350, 400, 450 e 500 g.kg<sup>-1</sup> de proteína;
- b) Avaliar a atividade enzimática (protease alcalina, protease ácida, lipase e amilase) dos juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com dietas isoenergéticas contendo 250, 300, 350, 400, 450 e 500 g.kg<sup>-1</sup> de proteína;

- c) Verificar os índices zootécnicos de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com seis dietas isoenergéticas e isoproteicas contendo a relação crescente de 2 a 7 de CHO/L;
- d) Avaliar a atividade enzimática (protease alcalina, protease ácida, lipase e amilase) dos juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com seis dietas isoenergéticas e isoproteicas contendo a relação crescente de 2 a 7 de CHO/L;

### **Formatação dos artigos**

O Desenvolvimento da tese está dividido em dois capítulos, sendo que o primeiro refere-se a um artigo formatado para o periódico “Aquaculture nutrition” e o segundo para o periódico “Aquaculture”.

## CAPÍTULO I

EXIGÊNCIA PROTEICA NA DIETA DE JUVENIS DE SARDINHA-  
VERDADEIRA, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879)

Fabio Carneiro Sterzelecki<sup>a</sup>; Juliet Kiyuoko Sugai<sup>c</sup>; Manecas Baloi<sup>a</sup>;  
Gabriel Passini<sup>a</sup>, Cristina Vaz Avelar de Carvalho<sup>a</sup>; Débora Machado  
Fracalossi<sup>b</sup>; Vinícius Ronzani Cerqueira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de  
Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, Santa  
Catarina, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI),  
Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC,  
Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<sup>c</sup>Laboratório de Enzimologia Aplicada, Departamento de Bioquímica,  
Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina,  
Brasil

## Resumo

Um experimento de seis semanas foi realizado para estimar a exigência de proteína na dieta para o crescimento de juvenis de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) com base no desempenho de crescimento, utilização do alimento, composição corporal e atividade de enzimas digestivas. Assim, seis dietas isoenergéticas foram formuladas para conter os níveis crescentes de proteína de 250, 300, 350, 400, 450 e 500 g.kg<sup>-1</sup>. Cada dieta foi aleatoriamente designada para grupos de 160 peixes em triplicatas com peso médio inicial de 0,93 ± 0,13 g alimentados quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente. O crescimento foi maior com o aumento de proteína na dieta até 400 g.kg<sup>-1</sup>. A ingestão total de proteína foi inversamente proporcional à utilização aparente de proteína. Não houve diferença significativa na composição centesimal dos peixes alimentados com os diferentes níveis de proteína. As atividades da protease ácida e lipase não diferiram significativamente. A atividade de protease alcalina foi maior nos peixes alimentados com 350 g.kg<sup>-1</sup> de proteína e a da amilase nos peixes alimentados com 400 g.kg<sup>-1</sup> de proteína. A exigência de proteína na dieta estimada para o ganho de peso máximo de juvenis de sardinhas-verdadeira foi de 367 g.kg<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** peixe marinho, proteína, crescimento, enzima digestiva, composição centesimal, nutrição.

## Abstract

A six-week growth trial was performed to estimate the dietary protein requirement for growth of juvenile Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) based on growth performance, feed utilization, body composition and digestive enzyme activity. Six isoenergetic diets were formulated to contain protein levels that increased from 250 to 500 g.kg<sup>-1</sup>. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 160 fish with mean initial body weight  $0.93 \pm 0.13$  g fed four times a day to apparent satiation. Growth tended to increase with the increase in dietary protein level up to 400 g.kg<sup>-1</sup> of protein diet. Total protein intake was indirectly correlated to apparent protein utilization. No significant differences for whole body composition were found between fish fed the different protein levels. Acid protease and neutral lipase activities did not show significant differences among different protein dietary groups. Alkaline protease activity increased in fish fed up to 350 g.kg<sup>-1</sup> of protein and amylase activity in fish fed up to 400 g.kg<sup>-1</sup>. Using polynomial regression, 367 g.kg<sup>-1</sup> was estimated to be the optimum dietary protein requirement for maximum weight gain of juvenile Brazilian sardines.

**Keywords:** marine fish, protein, growth, digestive enzyme, body composition, nutrition



## Introdução

A sardinha-verdadeira, *Sardinella brasiliensis* é um peixe pelágico que se organiza em cardume, distribuído entre o Cabo de São Tomé, Estado do Rio de Janeiro (22 ° S) e Cabo de Santa Marta, Santa Catarina (29 ° S), e é um dos mais importantes recursos pesqueiros marinhos no Brasil (Gigliotti et al., 2010; Perin e Vaz-dos-Santos, 2014). A sardinha-verdadeira não é apenas a base de uma importante indústria de sardinha em lata, mas também é amplamente utilizada como isca-viva para capturar o bonito-listrado, *Katsuwonus pelamis*. No entanto, o mercado de atum está ameaçado devido ao declínio das populações de peixes comumente usadas como isca-viva (Santos e Rodrigues-Ribeiro, 2000).

A produção de sardinha-verdadeira tem diminuído ao longo dos últimos 40 anos, devido a mudanças ambientais e à sobrepesca. Atingiu o pico em 1973, 228 000 toneladas, e desde então diminuiu continuamente (Jablonski, 2007), até 75 223 toneladas em 2011 (MPA, 2012). Neste contexto, a aquicultura é a melhor opção para atender a demanda e aliviar a pressão sobre o estoque sobre-explorado (Naylor et al., 2009).

Muitos estudos sobre a biologia e a pesca de sardinha-verdadeira têm sido realizados desde 1950, o que torna a sardinha a espécie mais estudada no Brasil (Cergole et al., 2002). É uma espécie clupeide com ciclo de vida curto, alta taxa de crescimento e alta fecundidade (Perin e Vaz-dos-Santos, 2014). Com comportamento alimentar diurno, a sardinha-verdadeira se alimenta de fito e zooplâncton nas fases iniciais e na fase adulta (Kurtz e Matsuura, 2001; Schneider e Schwingel, 1999). No entanto, os esforços para desenvolver a produção de sardinhas em cativeiro só iniciaram recentemente (Baloi et al., 2014) e a suas necessidades nutricionais ainda não foram definidas. A nutrição desempenha um papel-chave na indústria da aquicultura, influenciando o crescimento dos peixes, saúde e poluição e pode representar mais da metade dos custos de produção (NRC, 2011).

A proteína é um dos nutrientes mais caros e necessários na dieta, além de essencial para o desenvolvimento do peixe (Watanabe, 2002). Ela desempenha um papel chave em muitas funções biológicas, como estrutural, enzimático, transportador, imunológico e sinalização celular (NRC, 2011). A proteína da dieta é quebrada em moléculas menores no trato gastrointestinal, cuja secreção de fluídos, eletrólitos e enzimas digestivas permite os aminoácidos livres serem absorvidos e utilizados

(Buddington e Krogdahl, 2004). Uma dieta que contém excesso de proteína além da exigência do peixe promove a excreção de amônia e pode afetar a taxa de crescimento. Por outro lado, o baixo conteúdo de proteína na dieta afeta negativamente a saúde e o crescimento dos peixes. Em ambas as situações, os custos de produção aumentam (Lall e Tibbetts, 2009). Portanto, este estudo determinou a exigência de proteína da sardinha-verdadeira. Para isso, o efeito do aumento da concentração de proteína na dieta foi avaliado no crescimento, composição centesimal e enzimas digestivas dos juvenis.

## **Materiais e métodos**

### **Dieta experimental**

Seis dietas isoenergéticas semipurificadas contendo 250-500 g.Kg<sup>-1</sup> de proteína foram formuladas (Tabela 1). Como não há estudos prévios sobre a exigência nutricional da sardinha-verdadeira, a formulação foi baseada uma espécie marinha onívora semelhante, o peixe leite *Chanos chanos* (Borlongan e Coloso, 1993; Borlongan e Satoh, 2001; NRC, 2011). Contudo, essa espécie também possui lacunas, que foram preenchidas com a exigência do peixe onívoro tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (NRC, 2011).

As rações foram produzidas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI, UFSC). A farinha de peixe (resíduo de salmão), caseína e gelatina foram usadas como fonte de proteína, o óleo de girassol e o de fígado de bacalhau foram usados como fonte de lipídios e a dextrina como fonte de carboidrato. Para satisfazer os requisitos de fósforo, adicionou-se fosfato de cálcio dibásico. Todos os ingredientes foram misturados, peletizados em uma extrusora (1,5 mm) sem adição de temperatura e pressão, e secos a 50 °C durante 24 horas. Em seguida, as dietas experimentais foram moídas e peneiradas a 0,6 milímetros, colocadas em sacos plásticos e armazenadas no congelador a -20 °C até o uso.

### **Procedimentos experimentais**

Todos os indivíduos foram tratados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade (PP00861 / CEUA / PROPESQ / UFSC / 2013). As sardinhas brasileiras adultas foram induzidas com hormônio LHRHa para a desova, e as larvas foram criadas no laboratório com os alimento-

Tabela 1. Composição dos ingredientes e análise centesimal das dietas experimentais (matéria seca).

<b>Ingredientes (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>250</b>	<b>300</b>	<b>350</b>	<b>400</b>	<b>450</b>	<b>500</b>
Farinha de peixe <sup>1</sup>	140,0	160,0	166,2	177,6	190,0	210,0
Óleo de peixe <sup>2</sup>	87,0	82,5	82,5	71,5	67,5	50,0
Óleo de girasol	13,0	12,5	12,5	8,5	7,5	7,4
Premix <sup>3</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Dextrina <sup>4</sup>	447,5	409,2	363,8	340,0	300,0	270,0
Gelatina <sup>4</sup>	30,0	39,0	45,0	52,5	60,0	70,0
Caseína <sup>4</sup>	127,5	156,8	200,0	237,5	274,3	302,4
Celulose <sup>4</sup>	120,0	110,0	100,0	97,4	89,7	79,1
Fosfato de cálcio dibásico	25,0	20,0	20,0	5,0	1,0	1,0
<b>Composição da dieta (g.kg<sup>-1</sup>)</b>						
Matéria seca	121,9	119,9	113,0	123,0	113,1	101,2
Proteína bruta	246,7	299,7	345,1	385,8	442,4	486,3
Lipídio	119,8	119,6	113,4	114,4	113,8	101,2
Fibra em detergente ácido	20,6	26,1	21,1	17,2	23,7	22,3
Cinzas	53,3	52,0	54,1	41,4	36,7	40,3
n-3/n-6 calculado	2,02	2,47	2,38	1,97	1,97	1,99
Energia Bruta (MJ kg <sup>-1</sup> ) <sup>5</sup>	21,21	21,05	20,88	20,79	20,62	20,19
Proteína/Energia(kg MJ <sup>-1</sup> )	11,6	14,2	16,5	18,7	21,4	24,0

<sup>1</sup> Pesquera Pacific Star (Chile). Proteína bruta 728,0 g.kg<sup>-1</sup> ; Lipídio 123,1 g.kg<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> Delaware Ltda (Porto Alegre, RS, Brazil)

<sup>3</sup>Premix Nutron g/kg - manganês 2.600 mg, zinco 14.000 mg, ferro 10.000 mg , cobre 1.400 mg, cobalto 20 mg, iodo 60 mg, selênio 60 mg, vitamina a 1.000.000 UI, vitamina D<sub>3</sub> 400.000 UI, vitamina E 10.000 mg, vitamina K<sub>3</sub> 500 mg, vitamina B<sub>1</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>2</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>6</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>12</sub> 3.000 µg, vitamina C 35.000 mg, ácido fólico 500 mg, ácido pantotênico 5.000 mg, niacina 10.000 mg, biotina 80.000 mcg, colina 200.000 mg, metionina 130 g, inositol 5.000 mg, etoquin 15.000 mg.

<sup>4</sup> Rhoster Ltda. (São Paulo, SP, Brazil)

<sup>5</sup> Energia metabolizável baseada nos valores 16,7, 16,7 and 37,6 MJ para carboidratos, proteína e lipídio, respectivamente (Carvalho et al., 2010).

vivos rotíferos e artêmia, seguindo protocolo previamente desenvolvido (Baloi et al., 2014). Após o desmame, 2880 juvenis foram transferidos para 18 tanques circulares de plástico de 400 L , sendo 160 peixes por

tanque em sistema de fluxo contínuo (1,0 L min<sup>-1</sup>). Durante a primeira semana, os peixes foram aclimatados e alimentados ad libitum com INVE aquicultura NRD, Bélgica (550 g.kg<sup>-1</sup> de proteína, 130 g.kg<sup>-1</sup> lipídio e 4843 kcal / kg de energia). Antes de iniciar o experimento, os peixes foram privados da alimentação por 18 horas e trinta indivíduos em cada tanque foram pesados e medidos (0,93 ± 0,13 g; comprimento total 5,01 ± 0,20 cm). Um lote de 100 g (± 100 indivíduos) de peixe foi anestesiado com 50 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína (Reagen Ltda), sacrificados com água fria (2 ° C) e submetido a análise da composição centesimal. Cada dieta foi aleatoriamente designada em triplicata e os peixes foram alimentados à mão quatro vezes por dia até a saciedade visual aparente. O experimento durou seis semanas com fotoperíodo natural (14 horas de luz, 10 de escuro), temperatura da água a 20,65 ± 0,37 ° C, oxigênio dissolvido em 6,34 ± 0,33 mg.L<sup>-1</sup>, salinidade em 35, pH 8,27 ± 0,42 e NH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub> menor que 1 mg.L<sup>-1</sup>.

No final do experimento, antes da amostragem, os peixes foram privados de alimentação por 18 h. O comprimento total do corpo, peso e mortalidade de peixes em cada tanque foram observados para calcular o ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), eficiência alimentar (EA), utilização aparente de proteína (UAP) e sobrevivência. Para determinar a composição centesimal dos peixes, índice hepatossomático (IHS) e de gordura visceral somática (IGVS), 40 peixes de cada tanque foram anestesiados com benzocaína (50 mg L<sup>-1</sup>) e sacrificaram-se com água fria (2 ° C). Dois outros peixes por tanque foram sacrificados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -20 ° C para determinar a atividade das enzimas digestivas.

#### Análise de composição centesimal

As dietas e os peixes (carcaça inteira) foram analisados seguindo os procedimentos padronizados (AOAC, 1999). A matéria seca foi obtida por secagem no forno a 105 ° C até peso constante; as cinzas, por incineração num forno de mufla a 450 ° C durante 4 h, o conteúdo lipídico pelo método de extração com éter, a fibra por digestão ácida e a proteína bruta foi determinada por medição do nitrogênio (N x 6,25) através do método de Kjeldahl. Todas as análises seguiram os procedimentos padrão da Associação dos Químicos Analíticos Oficiais.

#### Ensaio enzimático

Os peixes foram individualmente dissecados e todo o seu trato gastrointestinal foi extraído, com exceção dos órgãos anexos descartados (hepatopâncreas e bile). As amostras foram homogeneizadas (tissue-tearor Biospec, Paulínia, Brasil) em água destilada resfriada (1:8, w/v), durante 3 minutos e centrifugadas a 28.230 g durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado para determinar as atividades enzimáticas e a quantidade de proteína solúvel.

Todos os ensaios enzimáticos foram incubados a 25 °C e a absorvância lida com um leitor de microplacas Spectramax, transferindo uma alíquota de 300 µL dos produtos de hidrólise no poço, com exceção para a atividade da lipase, cuja reação foi realizada diretamente nos poços da microplaca.

A análise da atividade total de protease alcalina foi realizada de acordo com García-Carreño (1997) pela hidrólise da azocaseína (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA). O controle (branco) foi feito pela adição de ácido tricloroacético 20% para o sistema de reação antes da adição de substrato. A atividade total da protease alcalina foi quantificada como Unidade de enzima (U) atividade específica, sendo a diferença na absorbância a 366 nm entre a amostra e seu controle branco por minuto, por mL de reação ( $\Delta$  absorbância de 366 nm.min<sup>-1</sup>.mL.min<sup>-1</sup>). Esta U dividida por mg de proteína no extrato bruto expressa a atividade específica da enzima.

A atividade da protease ácida foi determinada pelo método de Anson (1938), com modificações descritas por Vega-Orellana (2006). Os produtos solúveis da hidrólise do substrato (hemoglobina) no TCA foram quantificados através uma curva padrão de tirosina (Merck S.A., Darmstadt, Alemanha), cuja absorbâncias foram lidas em 280 nm. Um branco com extrato de enzima, adicionado depois da adição de TCA, foi preparado para descontar a hidrólise endógena. A atividade específica da protease ácida foi expressa como µmol de tirosina solúvel em TCA . min<sup>-1</sup>.mL.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína.

A atividade da amilase foi estimada pela hidrólise do amido solúvel (substrato), como descrito por Aguilar-Quaresma e Sugai (2005). Os produtos de reação (açúcares redutores) liberados foram analisados pelo método do ácido dinitrossalicílico, tal como descrito por Miller (1959) usando a maltose (E. Merck, Darmstadt, Alemanha) como padrão e leitura da absorbância feita a 540 nm. Um controle (branco) foi produzido para quantificar os açúcares redutores de origem endógena nos homogeneizados, e na solução de amido (substrato) devido a hidrólise, para serem descontados da atividade de cada amostra. A

atividade específica da amilase foi expressa como  $\mu\text{mol}$  de maltose.  $\text{min}^{-1}$ .  $\text{mL}^{-1}$ .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

A quantificação da atividade da lipase neutra foi conduzida de acordo com Sæle (2010) pela hidrólise do substrato 4- nitrophenil miristato. A atividade enzimática foi lida na microplaca a cada minuto pelo tempo total de 30 min a 404 nm e expressa como  $\mu\text{mol}$  de 4-nitrofenilmiristato hidrolisado  $\text{min}^{-1}$ .  $\text{mL}^{-1}$ .  $\text{mg}^{-1}$  de proteína, utilizando o valor de coeficiente de extinção molar de 4-nitrophenil. A microplaca foi lida a cada min durante 30 min a 404nm.

A proteína solúvel do extrato de bruto foi avaliada pelo método de Bradford (1976) com padrão de albumina de soro bovino (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).

### Análise estatística

Os dados foram submetidos primeiro a verificação de homogeneidade (teste Brown-Forsythe) e normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov). A composição centesimal, IHS, IGVS e atividade enzimática foram analisados por ANOVA de uma via seguido por um teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). A regressão polinomial de segunda ordem foi aplicada ao ganho de peso para determinar a exigência de proteína ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados

Todos os tratamentos tiveram uma taxa de sobrevivência elevada, acima de 98%, sem diferenças significativas. Em relação aos parâmetros de crescimento (Tabela 2), o peso final e taxa de crescimento específico foram superiores na concentração intermediária de proteína, 300-400  $\text{g.kg}^{-1}$  de proteína. Não houve diferenças significativas nos índices hepatossomático e de gordura visceral.

Em relação aos parâmetros de alimentação, (Tabela 2), apesar de não haver diferença significativa na ingestão de ração, a ingestão de proteína foi maior com o aumento da concentração de proteína na dieta. Por outro lado, a utilização de proteína aparente foi inversamente proporcional a quantidade de proteína ingerida (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de crescimento e de alimentação dos juvenis de sardinha-verdadeira tratados com seis dietas experimentais durante seis semanas.

item	Proteína na dieta (g.kg <sup>-1</sup> )					
	250	300	350	400	450	500
PI (g)	0,94±0,2	0,86±0,2	0,90±0,31	0,82±0,3	1,06±0,2	0,99±0,3
PF (g)	2,56±0,2 <sup>c</sup>	2,64±0,2 <sup>abc</sup>	2,86±0,2 <sup>ab</sup>	2,88±0,2 <sup>a</sup>	2,75±0,1 <sup>abc</sup>	2,62±0,2 <sup>bc</sup>
TCE (%)	2,37±0,0 <sup>b</sup>	2,67±0,2 <sup>ab</sup>	2,78±0,2 <sup>ab</sup>	3,03±0,4 <sup>a</sup>	2,28±0,4 <sup>b</sup>	2,35±0,4 <sup>b</sup>
IHS (%)	0,47±0,1	0,49±0,1	0,50±0,1	0,55±0,1	0,59±0,2	0,70±0,2
IGVS (%)	2,20±0,7	2,45±1,1	1,77±0,3	2,24±0,5	2,14±0,1	1,57±0,4
I (g)	18,8±2,1	19,7±0,8	22,8±0,86	20,8±2,2	18,25±1,9	18,1±2,7
IP (g)	4,7±0,51 <sup>c</sup>	5,9±0,2 <sup>bc</sup>	7,9±0,30 <sup>ab</sup>	8,0±0,83 <sup>a</sup>	8,1±0,85 <sup>a</sup>	8,8±1,30 <sup>a</sup>
EA (%)	34,7±1,5	36,5±2,3	35,0±1,8	40,3±3,2	37,8±4,37	36,9±5,7
UAP (%)	21,9±0,8 <sup>a</sup>	18,9±0,55 <sup>ab</sup>	16,2±1,1 <sup>bc</sup>	16,5±2,0 <sup>b</sup>	14,8±1,2 <sup>bc</sup>	11,9±2,9 <sup>c</sup>

Todos os parâmetros foram analisados por ANOVA e Tukey pos-teste. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão. Diferenças significativas na mesma linha entre os tratamentos são apontadas por letras diferentes (p<0.05).

(PI)= peso inicial;

(PF)= peso Final;

(TCE)= taxa de crescimento específico = [ln (media de peso final) - ln (média de peso inicial)/dias]\*100;

(IHS) = índice hepatossomático; 100 \* (peso do fígado/peso corporal);

(IGVS) = Índice de gordura viscerossomática = 100 \* (gordura visceral/peso corporal)

(I) Ingestão = ingestão de alimento (g)/peixe

(IP) Ingestão de Proteína = Ingestão de alimento/peixe \* proteína da dieta (g)

(EA)Eficiência alimentar = (ganho de peso úmido (g)/ingestão de alimento, matéria seca)

(UAP) Utilização aparente de proteína = [Peso final corporal (g) x proteína corporal final (g.kg<sup>-1</sup>)] – [peso inicial corporal (g) x proteína corporal inicial (g.kg<sup>-1</sup>)]/ ingestão de proteína (peso seco)(g) \* 100

A exigência de proteína bruta para o juvenil de sardinha-verdadeira juvenil foi estimada em 367,7 g.kg<sup>-1</sup>, de acordo com a análise

de regressão polinomial de segunda ordem sobre o ganho de peso (Fig. 1).

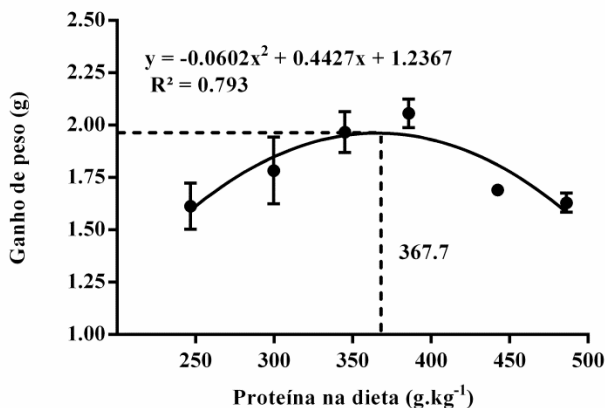


Figura 1. Regressão polinomial do ganho de peso da sardinha-verdadeira alimentada com concentrações crescentes de proteína durante seis semanas. Os dados são apresentados como média e desvio padrão ( $p < 0,05$ ).

A umidade, cinzas, lipídios e proteínas da composição corporal da sardinha-verdadeira não foram afetados pelas dietas experimentais (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal (peso úmido g.kg<sup>-1</sup>) da sardinha-verdadeira alimentada com as dietas experimentais durante seis semanas.

Dieta (g.kg <sup>-1</sup> )	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas
Inicial	785,4±1,1	27,9±1,5	49,0±0,4	131,8±0,5
250	734,0±14,2	35,3±1,2	81,7±7,1	144,1±7,7
300	729,3±8,6	34,9±3,2	87,4±2,0	144,9±3,1
350	732,0±3,5	33,8±0,8	81,8±3,9	148,2±2,1
400	729,9±7,6	33,7±2,1	84,6±9,8	148,4±6,2
450	722,8±13,3	35,8±2,6	81,5±2,2	154,5±4,5
500	743,7±6,5	35,4±1,5	64,3±4,4	143,5±10,2

Os resultados são mostrados como média ( $n=3$ ) ± desvio padrão. Não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

A atividade da protease ácida e da lipase, não foram afetadas significativamente (Fig. 2). Em contraste, a atividade da protease alcalina aumentou continuamente até o tratamento com 350 g.kg<sup>-1</sup> de



proteína e a atividade de amilase aumentou até 400 g.kg<sup>-1</sup> de proteína (Fig. 2). Quando a concentração de proteína da dieta ultrapassou os 400 g.kg<sup>-1</sup>, ambas as atividades enzimáticas diminuíram para níveis semelhantes aos encontrados com baixa concentração proteica.

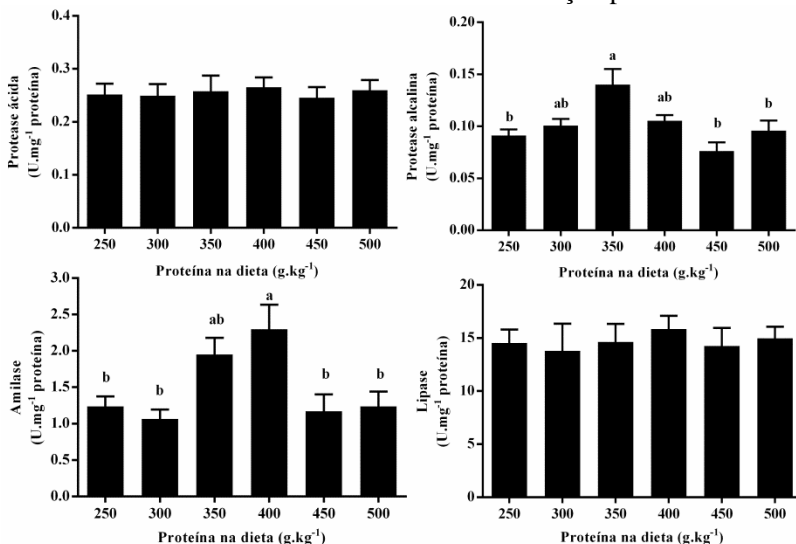


Figura 2. Atividade da protease ácida, alcalina, lipase e amilase no trato gastrointestinal de juvenis de sardinha-verdadeira alimentados com diferentes níveis de proteína durante seis meses. Os dados são mostrados como média± média do erro padrão (n=6). U representa  $\mu\text{mol}$  do produto formado  $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , exceto para protease alcalina que representa a diferença de absorvância em  $366 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Médias com diferentes letras apresentam diferenças significativas.

## Discussão

A deficiência ou excesso de cada componente da dieta pode ter um impacto profundo sobre o desenvolvimento de doenças e sobrevivência dos peixes (Lall e Tibbetts, 2009). No entanto, após seis semanas de experimento, os juvenis de sardinha-verdadeira não apresentaram diferença significativa na sobrevivência, indicando a adaptação frente a ingestão crescente de proteína.

A proteína dietética é normalmente utilizada para estimular o crescimento de peixes, mas após certo limite, o excesso de proteína não é excretado ou armazenado, ele é de fato convertido em combustível metabólico intermediário (Evans et al., 2005). Uma vez que a quantidade de proteína na ração não afetou o consumo alimentar, o

crescimento mais baixo encontrado nas dietas com grande concentração de proteína foi provavelmente devido ao uso da proteína excedida para energia, ao invés para o crescimento. Isso também explica por que a ingestão de proteína total e UAP foram inversamente influenciadas pelo aumento de proteína na ração. Essa associação também foi encontrada em outras espécies, diminuindo a UPA de 35,71 até 14,46% para a carpa *Labeo rohita* (Kumar et al., 2013), de 25,6 até 18,8% para o sargo *Diplodus cervinus* (Coutinho et al., 2016) e de 38,2 até 21,3% para sargo *Diplodus vulgaris* (Ozório et al., 2009), quando a ingesta de proteína foi aumentada.

A maioria dos peixes herbívoros e onívoros requerem 250-350 g.kg<sup>-1</sup> de proteína em sua dieta, enquanto que espécies carnívoras exigem nível superior que varia entre 400-550 g.kg<sup>-1</sup> da dieta (Lall e Tibbetts, 2009). No entanto, a quantidade depende de vários fatores como o estágio de vida, temperatura da água, a frequência de alimentação, energia de origem não proteica e a qualidade da proteína (Kumar et al., 2013). A exigência de proteína de juvenis de sardinha-verdadeira estimada pelo ganho de peso é de 367,7 g.kg<sup>-1</sup> correlacionando com outros peixes juvenis onívoros, como o peixe coelho marinho *Siganus rivulatus* (400 g.kg<sup>-1</sup>, El-Dakar et al., 2011), peixe leite, *Chanos chanos* (440 g.kg<sup>-1</sup>, Borlongan e Coloso, 1993) tainha *Mugil Liza* (350 g.kg<sup>-1</sup>, De Carvalho et al., 2010) sargo, (357 g.kg<sup>-1</sup>, Ozório et al., 2009) e gourami azul *Trichogaster trichopterus* (350 g.kg<sup>-1</sup>, Mohanta et al., 2013).

A dose-resposta sobre algum parâmetro de crescimento é largamente utilizada para estimar a exigência de um nutriente em determinadas espécies. No entanto, o perfil de atividade das enzimas digestivas pode ser usado para melhorar a formulação da ração (Debnath et al., 2007). A mudança na composição da dieta pode modular as atividades enzimáticas e capacidade de absorção de nutrientes, para melhorar o uso de ração e garantir o desempenho de crescimento (García-Meilán et al., 2013).

A atividade das enzimas digestivas pode ser influenciada por muitos fatores, como a qualidade da dieta, o manejo alimentar, o estágio de vida e o tempo de amostragem após a alimentação (García-Meilán et al., 2016b). A atividade da pepsina, por exemplo, é ligada ao pH gástrico que acidifica após a ingestão de alimentos, e dependendo do tempo de coleta após a alimentação, pode trazer diferentes resultados (García-Meilán et al., 2016a). Essa pode ser a razão de existir dados contrastantes na atividade da protease ácida nos peixes alimentados com níveis crescentes de proteína. Enquanto a protease ácida, por exemplo,

responde positivamente no Tambaqui, *Colossoma macopomum* e cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum* (de Almeida et al, 2006; Cornélio et al, 2014), o nível da atividade parece ter pouco influência pela quantidade de proteína na dieta das larvas (Zambonino Infante e Cahu, 2007) ou até mesmo sem efeito, como encontrado em outros estudos sobre tambaqui (Kohla et al., 1992) e pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Lundstedt et al., 2004). No presente estudo, a atividade proteolítica ácida não respondeu aos níveis crescentes da proteína ingerida após 18 horas da última alimentação.

Em contraste, a atividade total da protease alcalina da sardinha-verdadeira respondeu ao teor de proteína na dieta. O aumento significativo da atividade em 350 g.kg<sup>-1</sup> coincidiu com o melhor crescimento definido pela regressão polinomial. Essa associação é possível também encontrar em estudos anteriores sobre a carpa *Labeo rohita* (300 g.kg<sup>-1</sup>, Debnath et al., 2007), pintado (400 g.kg<sup>-1</sup>; Lundstedt et al., 2004) e cachara (492 g.kg<sup>-1</sup>, Cornélio et al., 2014). No entanto, a atividade da protease não está sempre associada com o melhor crescimento em peixes, como o observado em tainha (Carvalho et al., 2010). Em algumas espécies, enzimas pancreáticas, tais como proteases, amilases e lipases respondem positivamente ao aumento dos níveis de proteínas, lipídios e carboidratos, e são reguladas por hormônios (Buddington e Kroghdahl, 2004). A secreção das enzimas pancreáticas é mediada pela colecistocinina, que por sua vez é regulada positivamente e indiretamente pelo nível de proteína na dieta (Zambonino Infante e Cahu, 2007).

Os peixes onívoros mostram menores exigências de proteína do que peixes carnívoros, devido à sua maior capacidade de utilizar carboidratos como fontes de energia (Polakof et al., 2012). A amilase é uma enzima que tem um papel central na hidrólise de polissacarídeos como o amido, e no presente estudo, mostrou aumento de atividade entre 350 e 400 g.kg<sup>-1</sup> de proteína, o que corresponde a 363,8 e 340 g.kg<sup>-1</sup> de dextrina, respectivamente. A substituição gradual de proteína nas dietas experimentais do presente estudo foi realizada principalmente pela adição de dextrina, um carboidrato altamente digerível. Portanto, podemos supor que a sardinha-verdadeira é capaz de digerir altos níveis de carboidratos. Em muitas espécies de peixes, a amilase correlaciona-se positivamente com níveis de carboidratos e intensidade de ingestão da dieta (Kroghdahl et al., 2005).

Em geral, as espécies onívoras e herbívoras podem tolerar altos níveis de carboidratos em suas dietas, sem efeitos prejudiciais. Por exemplo, nenhuma influência negativa no desempenho do crescimento

foi observado na tilápia-do-Nilo (Azaza et al., 2015) e tainha (Zamora-Sillero et al., 2013), quando eles foram alimentados até 322 g.kg<sup>-1</sup> e 463,9 g.kg<sup>-1</sup> de carboidratos, respectivamente. Já a carpa-capim *Ctenopharyngodon idella* mostrou um aumento de crescimento com a inclusão de amido de milho até 314 g.kg<sup>-1</sup> (Gao et al., 2010).

A lipase mais importante em peixes teleósteos é a lipase dependente de sais biliares (Sæle et al., 2010). Em geral, a atividade da enzima responde aos lipídios na dieta, como ocorrido no tambaqui *Colossoma macropomum* (De Almeida et al., 2006) e no barbo, *Puntius gonionotus* (Mohanta et al., 2008). A atividade da lipase na sardinha-verdadeira não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, provavelmente devido ao constante teor de lipídios nas dietas experimentais. A carpa *Labeo rohita* também não apresentou diferença significativa na atividade da lipase quando os juvenis foram alimentados com diferentes concentrações de proteína e teor de lipídios semelhantes (Debnath et al., 2007).

Concluindo, com base nos parâmetros de crescimento, os juvenis de sardinha-verdadeira tem exigência de proteína bruta de 367,7 g.kg<sup>-1</sup>. A atividade da protease alcalina e amilase está associada ao teor de proteína e carboidrato da dieta, respectivamente, podendo ser usadas como ferramentas na formulação de ração.

## Agradecimentos

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro a este projeto e pela bolsa de doutorado para o primeiro autor (AUX-PE 879/2010 Ciências do Mar). Também gostaríamos de agradecer aos laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina (LAPMAR, LABCAI, LABNUTRI e Laboratório de Enzimologia Aplicada) pelo apoio técnico e ao Hilton Hiroshi Oshima (Cargill Nutrição Animal) por fornecer o premix de minerais e vitaminas.

## Referências

Aguiar-Quaresma, J., Sugai, J.K., 2005. Circadian profile of feed consumption and amylase and maltase activities in the juvenile shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. J. World Aquac. Soc. 36, 141–147. doi:10.1111/j.1749-7345.2005.tb00141.x

Almeida, L.C., Avilez, I.M., Honorato, C.A., Hori, T.S.F., Moraes, G.,

2006. Growth and methabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/j.1365-2095.2010.00759.x
- Anson, B.Y.M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 79–89. doi:10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC, 1999. Official Methods of Analysis of AOAC International. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. Method ce 2-66. doi:10.3109/15563657608988149
- Azaza, M.S., Khiari, N., Dhraief, M.N., Aloui, N., Kriem, M.M., Elfeki, A., 2015. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. *Aquac. Res.* 46, 14–27. doi:10.1111/are.12153
- Baloi, M., de Carvalho, C.V.A., Sterzelecki, F.C., Passini, G., Cerqueira, V.R., 2014. Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). *Aquac. Res.* 47, 554–560. doi:10.1111/are.12514
- Borlongan, I.G., Coloso, R.M., 1993. Requirements of juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) for essential amino acids. *J. Nutr.* 123, 125–132.
- Borlongan, I.G., Satoh, S., 2001. Dietary phosphorus requirement of juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). *Aquac. Res.* 32, 26–32. doi:10.1046/j.1355-557x.2001.00003.x
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Buddington, R.K., Krogdahl, Å., 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 139, 261–271. doi:10.1016/j.cbpb.2004.09.007
- Carvalho, C.V.A., Bianchini, A., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., 2010. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquac. Res.* 41, 511–518. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02340.x

Cergole, M.C., Saccardo, S.A., Rossi-wongtschowski, C.L.D.B., 2002. Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997. *Rev. Bras. Oceanogr.* 50, 13–26. doi:10.1590/S1679-87592002000100002

Cornélio, F.H.G., da Cunha, D.A., Silveira, J., Alexandre, D., Silva, C.P., Fracalossi, D.M., 2014. Dietary protein requirement of juvenile cachara catfish, *pseudoplatystoma reticulatum*. *J. World Aquac. Soc.* 45, 45–54. doi:10.1111/jwas.12090

Coutinho, F., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Magalhães, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2016. Dietary protein requirement of zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe 1838) juveniles. *Aquac. Nutr.* 22, 465–471. doi:10.1111/anu.12269

Debnath, D., Pal, a K., Sahu, N.P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., Venkateshwarlu, G., 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 146, 107–114. doi:10.1016/j.cbpb.2006.09.008

El-Dakar, A.Y., Shalaby, S.M., Saoud, I.P., 2011. Dietary protein requirement of juvenile marbled spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquac. Res.* 42, 1050–1055. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02694.x

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003

Gao, W., Liu, Y.J., Tian, L.X., Mai, K.S., Liang, G.Y., Yang, H.J., Huai, M.Y., Luo, W.J., 2010. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquac. Nutr.* 16, 327–333. doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x

García-Carreño, F.L., Toro, A.N. del, Ezquerra, M., 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 36–40.

García-Meilán, I., Ordóñez-Grande, B., Machahua, C., Buenestado, S., Fontanillas, R., Gallardo, M.A., 2016a. Effects of dietary protein-to-lipid ratio on digestive and absorptive processes in sea bass fingerlings. *Aquaculture* 463, 163–173. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.05.039

- García-Meilán, I., Ordóñez-Grande, B., Valentín, J.M., Hernández, M.D., García, B., Fontanillas, R., Gallardo, M.A., 2016b. Modulation of digestive and absorptive processes with age and/or after a dietary change in gilthead sea bream. *Aquaculture* 459, 54–64. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.021
- García-Meilán, I., Valentín, J.M., Fontanillas, R., Gallardo, M.A., 2013. Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects on digestive and absorptive processes. *Aquaculture* 412–413, 1–7. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.06.031
- Gigliotti, E.S., Gherardi, D.F.M., Paes, E.T., Souza, R.B., Katsuragawa, M., 2010. Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. *J. Fish Biol.* doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02802.x
- Jablonski, S., 2007. The Brazilian sardine. Is there any room for modelling? *Panam. J. Aquat. Sci.* 2, 86–93.
- Kohla, U., Saint-Paul, U., Friebe, J., Wernicke, D., Bfa, V.H., Bravm, E., Gropp, J., 1992. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. *Aquac. Res.* 23, 189–208. doi:10.1111/j.1365-2109.1992.tb00610.x
- Krogdahl, Å., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Saravanan, S., Priyadarshi, H., 2013. Short-term exposure to higher temperature triggers the metabolic enzyme activities and growth of fish *Labeo rohita* fed with high-protein diet. *Aquac. Nutr.* 19, 186–198. doi:10.1111/j.1365-2095.2012.00951.x
- Kurtz, F.W., Matsuura, Y., 2001. Food and feeding ecology of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) larvae from the southeastern Brazilian Bight. *Rev. bras. Ocean.* 49, 61–74. doi:10.1590/S1679-87592001000100006
- Lall, S.P., Tibbetts, S.M., 2009. Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 12, 361–372. doi:10.1016/j.cvex.2009.01.005
- Lundstedt, L.M., Melo, J.F.B., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei:

Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol.* - B Biochem. Mol. Biol. 137, 331–339. doi:10.1016/j.cbpc.2003.12.003

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. doi:10.1021/ac60147a030

Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J.K., Sahu, N.P., 2008. Optimal dietary lipid level of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings in relation to growth, nutrient retention and digestibility, muscle nucleic acid content and digestive enzyme activity. *Aquac. Nutr.* 14, 350–359. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00542.x

Mohanta, K.N., Subramanian, S., Korikanthimath, V.S., 2013. Effect of dietary protein and lipid levels on growth, nutrient utilization and whole-body composition of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 97, 126–136. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01258.x

MPA, 2012. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - 2010. *Bol. Estatístico da Pesca e Aquicultura* 129. doi:10.1007/s12032-011-9855-6

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–10. doi:10.1073/pnas.0905235106

NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, National Academies Press. doi:10.17226/13039

Ozório, R.O.A., Valente, L.M.P., Correia, S., Pousio-Ferreira, P., Damasceno-Oliveira, A., Escórcio, C., Oliva-Teles, A., 2009. Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. *Aquac. Nutr.* 15, 85–93. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00570.x

Perin, S., Vaz-dos-Santos, A.M., 2014. Morphometry and relative growth of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) in the Southeastern Brazilian bight. *Arq. Zool.* 45, 63–72.

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* doi:10.1007/s00360-012-0658-7

Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hamre, K., 2010.



Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 157, 252–259. doi:10.1016/j.cbpa.2010.07.003

Santos, R.C. dos, Rodrigues-Ribeiro, M., 2000. Demanda de iscas vivas para a frota atuneira Catarinense na safra de 1998/99: cpue , composição e distribuição das capturas. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 4, 97–101. doi:dx.doi.org/10.14210/bjast.v4n1.p97-101

Schneider, F., Schwingel, P.R., 1999. A preliminary study on the trofic ecology of *Sardinella brasiliensis* of southern Brazil 3, 67–72.

Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic fish feeds. *J Fish Sci* 68 SRC-G, 242–252.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98–105. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.032

Zamora-Sillero, J., Ramos, L.R. V, Romano, L.A., Monserrat, J.M., Tesser, M.B., 2013. Effect of dietary dextrin levels on the growth performance, blood chemistry, body composition, hepatic triglicerides and glycogen of lebranche mullet juveniles (*mugil liza valenciennes* 1836, *mugilidae*). *J. Appl. Ichthyol.* 29, 1342–1347. doi:10.1111/jai.12255



## CAPÍTULO II

### EXIGÊNCIA DA RELAÇÃO CARBOIDRATO/LIPÍDIO DA DIETA DE JUVENIS DE SARDINHA-VERDADEIRA, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879)

Fabio Carneiro Sterzelecki <sup>a</sup>; Juliet Kiyuoko Sugai<sup>c</sup>; Manecas Baloi<sup>a</sup>; Gabriel Passini<sup>a</sup>, Cristina Vaz Avelar de Carvalho<sup>a</sup>; Débora Machado Fracalossi<sup>b</sup>; Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<sup>c</sup>Laboratório de Enzimologia Aplicada, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

## Resumo

A disponibilidade de isca-viva utilizada para capturar o bonito-listrado *Katsuwonus pelamis* é o gargalo para aumentar a produção de atum em muitas partes do mundo. Para cultivar a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e utilizá-la como isca-viva, é necessário conhecer suas exigências nutricionais. Portanto, o presente estudo determinou a exigência de carboidratos e lipídios (CHO/L) na dieta de sardinha-verdadeira juvenil com base no desempenho de crescimento, utilização do alimento, composição centesimal, parâmetros sanguíneos e atividade das enzimas digestivas. Seis dietas isoenergéticas e isoprotéicas, foram formuladas para conter as relações de CHO/L de 2 a 7. Cada dieta foi aleatoriamente designada para grupos de 100 peixes em triplicatas com peso médio inicial de  $2,97 \pm 0,51$  g alimentados quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente. A sobrevivência não foi afetada, no entanto, a baixa relação CHO/L estimulou o crescimento. Os juvenis alimentados com dieta rica em carboidratos ingeriram uma quantidade menor de ração. A gordura corporal aumentou com aumento da concentração de lipídios na dieta e foi inversamente proporcional à umidade do corpo. As dietas não afetaram os parâmetros sanguíneos dos juvenis. As atividades da protease alcalina e ácida não foram significativamente diferentes, mas a lipase e amilase responderam positivamente aos lipídios e carboidratos na dieta, respectivamente. Com base na regressão segmentada, 3,41 foi estimada como a proporção de CHO/L ótima para o ganho de peso máximo de juvenis de sardinha-verdadeira, o que corresponde a cerca de 30 e 8,8% da dieta de carboidratos e lipídios, respectivamente.

**Palavras-chave:** Isca-viva. Utilização de alimento. Crescimento. Enzimas digestivas. Composição centesimal. Metabólito sanguíneo.

## Abstract

The availability of live bait used to capture the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* is the bottle neck to increase tuna production in many parts of the world. Therefore, a nutrition trial was performed to produce the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) as live bait. The present study determined the dietary carbohydrate and lipid (CHO/L ratio) requirement for juvenile Brazilian sardine based on growth performance, feed utilization, body composition, blood metabolites and digestive enzyme activity. Six isoenergetic and isonitrogenous diets were formulated to contain increased CHO/L ratios from 2 to 7. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 100 fish with mean initial body weight  $2.97 \pm 0.51$  g fed four times a day to apparent satiation. Survival was not affected, however, low CHO/L ratio stimulated growth. Juveniles fed with rich-carbohydrate diet have decreased feed and protein intake. Body lipid increased as dietary lipid increased and were inversely correlated to body moisture. The diets did not affect juvenile's blood metabolites. Alkaline and acid protease activities were not significantly different, but lipase and amylase responded positively to the dietary lipid and carbohydrate. Using segmented regression, 3.41 was estimated to be the optimum CHO/L ratio requirement for maximum weight gain of juvenile Brazilian sardines, which contain approximately 30 and 8.8 % of dietary carbohydrate and lipid, respectively.

**Keywords:** Live bait. Feed utilization. Growth. Digestive enzyme. Body composition. blood metabolite.

## Introdução

Os peixes pelágicos de pequeno porte suportam os maiores mercados pesqueiros no mundo, como a das anchovas e sardinhas. Os estoques dessas espécies estão esgotados em muitas áreas por causa da sobrepesca e das alterações ambientais (Ganias, 2014). A sardinha-verdadeira é um dos recursos marinhos mais importantes do Brasil em termos de desembarques (Bakun et al, 1990; FAO, 2016 ; MPA, 2012). Enquanto os indivíduos adultos são usados para fins alimentares (Dallagnolo et al., 2010), o juvenil é utilizado como isca-viva para capturar bonito-listrado *Katsuwonus pelamis* (Andrade e Teixeira Santos, 2004), a espécie de atum de maior produção (Senina et al., 2008 ). No entanto, ambas as atividades estão ameaçadas porque o estoque de sardinha-verdadeira também está sobre-explorado (Cergole et al., 2002).

Tal como no Brasil, a pesca de vara e isca está presente em muitas partes do mundo (Senina et al., 2008), e a disponibilidade adequada de isca-viva representa uma das principais barreiras (Collette e Nauen, 1983). Um estudo recente mostrou que na temporada de pesca de atum de 2010-2011, 733 milhões de juvenis de sardinha-verdadeira foram capturados na costa brasileira para serem utilizados como isca-viva, um impacto estimado de 18.800 a 31.000 t no estoque adulto (Occhialini, 2013) representando até 43,5% da produção total dessa espécie em 2011 (MPA, 2012). Portanto, entre os esforços que poderiam evitar o colapso da população de sardinha-verdadeira, está a produção de isca-viva em cativeiro (Cergole e Dias-Neto, 2011). Sabe-se que a aquicultura pode aliviar a pressão sobre os estoques naturais e desenvolver uma atividade sustentável (Naylor et al., 2009).

A sardinha-verdadeira pertence a um dos gêneros dominantes em termos de desembarques totais da pesca mundial (Bakun et al., 1990; FAO, 2016) confinado a costa sudeste brasileira entre Cabo Frio e Cabo de Santa Marta (Gigliotti et al, 2010). Devido à importância econômica, os primeiros estudos sobre a sardinha-verdadeira começaram em 1950 (Cergole et al., 2002), mas para fins de aquicultura só começou recentemente (Baloi et al., 2014). É um clupeídeo com ciclo de vida curto, alta taxa de crescimento e fecundidade (Perin e Vaz-dos-Santos, 2014), e, portanto, é um bom candidato para a Piscicultura. Com comportamento alimentar diurno, a sardinha-verdadeira se alimenta de fito e zooplâncton durante toda sua vida na natureza (Kurtz e Matsuura, 2001; Schneider e Schwingel, 1999). Em cativeiro, estudos anteriores já determinaram o regime de alimentação (Baloi et al., 2014, Baloi et al., no prelo) e exigência de proteína na dieta (36,67%, Sterzelecki et al., no

prelo) para os juvenis. No entanto, ainda faltam outras determinações nutricionais importantes, como a exigência de energia não-proteica da dieta.

Uma dieta ideal deve fornecer todos os nutrientes essenciais e energia necessária para satisfazer as necessidades fisiológicas dos animais em crescimento ou para a reprodução bem sucedida dos reprodutores. Proteínas, lipídios e carboidratos são importantes macronutrientes com rendimento energético para os peixes (Lall e Tibbetts, 2009), no entanto, a sua inclusão na alimentação têm vantagens e desvantagens.

Os peixes são conhecidos por utilizarem preferencialmente proteínas a lipídios ou carboidratos como fonte de energia (Mohanta et al., 2008; Peres e Oliva-Teles, 1999). No entanto, a proteína é o nutriente mais caro (Watanabe, 2002) e o excesso na dieta é convertido em combustível metabólico intermediário (Evans et al., 2005), aumentando a excreção de amônia na água e consequentemente a poluição (Carvalho et al., 2010). Portanto, é importante do ponto de vista nutricional, ambiental e econômico melhorar a utilização de proteína para a síntese de tecidos, em vez de fins energéticos (Mohanta et al., 2008).

Os lipídios são importante classe de nutrientes para o fornecimento de energia e ácidos graxos essenciais, além de veículo para as vitaminas e precursor de hormônios (Lall e Tibbetts, 2009; Watanabe, 2002). Mas, a principal fonte lipídica de alimentos para animais aquáticos, o óleo de peixe, está se tornando escasso por causa do aumento da demanda da Aquicultura (Watanabe, 2002) e a deficiência ou excesso pode afetar a saúde, crescimento e a composição corporal do peixe (Cowey e Sargent, 1977; Ghanawi et al., 2011; Lin e Shiau, 2003).

Apesar de que nenhuma exigência em carboidrato tenha sido determinada nos peixes (NRC, 2011), é a classe mais abundante de nutrientes energéticos, além de economicamente indispensável nas formulações de ração comercial para os peixes. A capacidade dos peixes de cativeiro em usar a energia a partir de carboidratos difere de acordo com seus hábitos alimentares, características anatomo-fisiológica e condições de criação (Kamalam et al., 2016).

Portanto, o presente estudo determinou a proporção de energia não proteica na dieta de juvenis de sardinha-verdadeira. Para isso, o efeito de diferentes taxas de CHO/L foi verificado nos parâmetros de crescimento, utilização de alimento, composição centesimal, metabólitos sanguíneos e enzimas digestivas.

## Materiais e métodos

### Desenho experimental

Os juvenis de sardinha-verdadeira foram obtidos a partir de uma desova induzida pelo uso de um análogo de hormônio luteinizante liberador de hormônio (LHRHa) em 40 peixes capturados na costa de Florianópolis, SC, Brasil. As larvas foram criadas em tanques de 5000 L e alimentadas inicialmente com rotíferos (*Brachionus rotundiformes*) e *Artemia* sp.. Após a transição para uma dieta artificial com INVE aquicultura NRD, Bélgica (55 % de proteína, 13% lipídio e 20, 26 kJ.g<sup>-1</sup> de energia), 1800 indivíduos (2,97 ± 0,51 g) foram distribuídos aleatoriamente em 18 tanques de polietileno (100 peixes por tanque), preenchidos com 400 L de água salgada (salinidade 35), mantidos por um sistema de recirculação (fluxo de 2 L.min<sup>-1</sup>). Durante os três primeiros dias, os peixes foram aclimatados e alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia (8:00, 12:00, 16:00), com dieta comercial (matéria seca 92,72%, proteína bruta 44,27%, lipídio 25,10% e energia bruta 19,58 KJ .g<sup>-1</sup>) e mantidos em fotoperíodo natural (14 h luz: 10 h escuro). Após o período de aclimação, foram mantidos nestas condições, com exceção da alimentação, alterada para seis dietas experimentais, cada uma oferecida para três tanques de peixes durante 32 dias. A temperatura da água (22,9 ± 1,3 °C) e oxigênio dissolvido (5,18 ± 0,13 mg.L<sup>-1</sup>) foram verificados diariamente com oxímetro(YSI PRO 20, Ohio, EUA). A amônia total, nitrito e nitrato foram monitorados semanalmente com fotocolorímetro (Alfakit AT 10P, Florianópolis, Brasil) e mantidos em níveis baixos (0,41 ± 0,34, 0,16 ± 0,14, 0,07 ± 0,07 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente) devido a um sistema de filtro biológico, mecânico e a troca parcial de água (20%). O pH verificado foi de 8,17 ± 0,23 (YSI EcoSense, Ohio, EUA).

### Formulação das dietas

As dietas foram formuladas com base nas exigências do peixe-leite *Chanos chanos* onívoro (Borlongan e Coloso 1993, NRC, 2011, Borlongan e Satoh, 2001) e tilápia-do-Nilo (NRC, 2011), com exceção da proteína, determinada pelo estudo anterior sobre a sardinha-verdadeira (Sterzelecki et al., no prelo). As dietas semipurificadas, isoenergéticas e isoproteicas foram formuladas para conter seis relações de Carboidratos/lipídios (2,3,4,5,6 e 7) ajustando o conteúdo carboidratos e lipídios (Tabela 4).



Tabela 4. Formulação e composição das dietas experimentais.

<b>CHO/L</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Ingredientes (g/100g)</b>						
Farinha de peixe <sup>1</sup>	20	20	20	20	20	20
Óleo de peixe <sup>2</sup>	8,43	6,61	4,81	3,9	3,38	2,98
Óleo de girassol	1	0,8	0,6	0,5	0,4	0,4
Premix <sup>3</sup>	4	4	4	4	4	4
Dextrina <sup>4</sup>	24,74	30,93	32,99	36,08	40,21	43,3
Gelatina <sup>4</sup>	4	4	4	4	4	4
Caseína <sup>4</sup>	20,8	20,63	20,57	20,49	20,38	20,29
Celulose <sup>4</sup>	15,03	11,03	11,03	9,03	5,63	3,03
Fosfato dibásico de sódio	2	2	2	2	2	2
<b>Composição centesimal (g/100g matéria seca)</b>						
Matéria seca	91,87	88,14	89,67	90,26	92,14	91,82
Proteína bruta	35,43	34,69	35,18	34,08	36,16	35,54
Lipídio	11,68	8,79	7,71	6,84	6,72	6,25
Cinzas	5,95	5,51	6,76	7,39	8,24	7,93
Carboidrato <sup>5</sup>	24	30	32	35	39	42
CHO/L	2,05	3,41	4,15	5,11	5,80	6,72
n-3/n-6 calculado	2,37	2,36	2,30	2,24	2,44	2,20
Energia (MJ kg <sup>-1</sup> ) <sup>6</sup>	14,6	14,91	14,49	14,61	15,05	15,41

<sup>1</sup> Pesquera Pacific Star (Chile). Proteína bruta 65.26% na matéria seca, Lipídio 12.23%.

<sup>2</sup> Óleo de peixe Campestre (SP, Brasil) e óleo de fígado-de-bacalhau Delaware Ltda (Porto Alegre, RS, Brazil) (3:1)

<sup>3</sup>Cargill® (Toledo, PR, Brazil ) manganês 2.600 mg, zinco 14.000 mg, ferro 10.000 mg , cobre 1.400 mg, cobalto 20 mg, iodo 60 mg, selênio 60 mg, vitamina a 1.000.000 UI, vitamina D<sub>3</sub> 400.000 UI, vitamina E 10.000 mg, vitamina K<sub>3</sub> 500 mg, vitamina B<sub>1</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>2</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>6</sub> 2.500 mg, vitamina B<sub>12</sub> 3.000 µg, vitamina C 35.000 mg, ácido fólico 500 mg, ácido pantotênico 5.000 mg, niacina 10.000 mg, biotina 80.000 mcg, colina 200.000 mg, metionina 130 g, inositol 5.000 mg, etoxiquin 15.000 mg.

<sup>4</sup> Rhoster Ltda. (São Paulo, SP, Brazil)

<sup>5</sup> O carboidrato foi calculado à partir da composição da dextrina..

<sup>6</sup> Energia metabolizável baseada nos valores 16.7, 16.7 and 37,6 MJ para carboidratos, proteína e lipídio, respectivamente (Carvalho et al., 2010).

A farinha de peixe (resíduo de salmão), caseína e gelatina foram utilizadas como fonte de proteína e a dextrina como fonte de carboidrato. Os óleos de peixe e girassol foram usados para atender às exigências de HUFA e PUFA dos peixes marinhos. As dietas foram preparadas em primeiro lugar com a mistura dos ingredientes secos, seguido dos óleos de peixe e de girassol e finalmente com água, até 15% de umidade. As misturas foram peletizadas a 1,5 mm e foram secas em estufa a 50 °C durante 6 horas e finalmente quebradas e peneiradas em 0,8 mm. Todas as dietas foram armazenadas a -20 °C em sacos plásticos até serem utilizadas.

### Amostragem

Antes das amostragens inicial e final, os peixes passaram por jejum de 18 horas, anestesiados com (50 mg L<sup>-1</sup> de benzocaína, Reagen Ltda., Curitiba, Brasil) e amostrados de acordo com os métodos aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP00861 do CEUA/PROPESQ/UFSC de 2013). Para os parâmetros de crescimento, 30 peixes por tanque foram medidos e pesados, e para a atividade de enzimas digestivas, dois peixes por tanque foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20 °C. Para análise dos metabólitos sanguíneos, de seis a nove peixes foram amostrados pela veia caudal com seringa hipodérmica (1 mL) contendo uma gota de anticoagulante (15 g.dL<sup>-1</sup> de EDTA), e o plasma separado em seguida por centrifugação (10 min, na microcentrífuga, a 2000 G, a 4 °C) e armazenado a -20 °C. Em cada tanque, um outro grupo de 100 g de peixe (20 a 50 indivíduos) foi congelado a -20 °C para análise de composição centesimal.

### Análise de metabólitos sanguíneos

As amostras foram descongeladas em gelo e cuidadosamente homogeneizadas antes da análise. Todos os metabólitos sanguíneos de sardinha-verdadeira foram analisados utilizando protocolos de Kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), com exceção da Glicose, que foi medida através de um glicômetro digital OneTouch® Ultra®blood, Johnson & Johnson Medical, São Paulo, Brasil).

## Composição centesimal

A composição centesimal dos peixes e da dieta foi realizada de acordo com os métodos especificados pela AOAC (1999). A proteína bruta ( $N \times 6,25$ ) foi determinada utilizando o método de Kjeldahl. A matéria seca por secagem num forno a  $105^{\circ}C$  até peso constante. As cinzas foram verificadas por meio de incineração num forno mufla a  $450^{\circ}C$  durante 4 h. O teor de lipídios foi determinado através do método de extração com éter e a fibra através da digestão neutra. O carboidrato foi calculado através da composição dos ingredientes.

## Ensaio das enzimas digestivas

O trato gastrointestinal dos peixes foi dissecado e os órgãos digestórios anexos (vesícula biliar e fígado) foram descartados. As amostras de trato digestório foram homogeneizadas (tissue-tearor Biospec, Paulínia, Brasil) com água destilada gelada (1:8 w:v) durante 3 min e centrifugadas a 28.230 g durante 15 min a  $4^{\circ}C$ . O sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio de enzimas e na determinação de proteína solúvel.

Os sistemas de reações enzimáticas foram montados em microtubos num ensaio de endpoint a  $25^{\circ}C$  e os produtos da hidrólise quantificados no leitor de microplacas, exceto para a atividade de lipase, que foi totalmente acompanhado nos poços da microplaca através de um ensaio cinético.

A atividade total de protease alcalina foi determinada conforme Garcia-Carreño (1997) usando azocaseína (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, EUA) como substrato e o produto de sua hidrólise lido a 366 nm. A atividade total da protease ácida foi verificada de acordo com o método de Anson (1938), modificado por Vega-Orellana et al. (2006). A quantificação da hidrólise de hemoglobina (substrato) foi lida a 280 nm e determinado com uma curva padrão de tirosina (Merck S.A., Darmstadt, Alemanha).

A atividade da amilase foi determinada de acordo com Aguilar-Quaresma e Sugai (2005), que utiliza amido solúvel como substrato e o produto dessa hidrólise foi quantificado usando uma curva padrão de maltose, determinada pelo método de ácido dinitrosalicílico com leitura a 540 nm.

O ensaio da lipase foi realizado de acordo com Sæle (2010), onde o produto de hidrólise de 4-nitrophenilmiristato foi determinado pela leitura da absorbância a 404 nm a cada minuto durante 30 min.

A proteína solúvel de cada amostra foi avaliada utilizando o método de Bradford (1976). As atividades enzimáticas foram expressas como  $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína, onde U é definido como  $\mu\text{mol}$  de produto gerado  $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ , exceto para a protease alcalina, que U significa a diferença na absorbância a 366 nm entre a amostra e o branco  $\cdot \text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ .

#### Cálculos e análise estatística

Ganho de peso (GP; g) = Pf-Pi

Taxa de crescimento específico (TCE, %  $\text{dia}^{-1}$ ) =  $100 \times (\text{LnPf} - \text{LnPi}) / t$

Ingestão Total (IT, g material seco) = total de ração consumida por peixes por 32 dias.

Ingestão de proteína total (IPT) = ingestão de proteína total por peixes por 32 dias

Eficiência alimentar (EA) =  $\text{ganho de peso (g, peso úmido)} / \text{ração consumida (g, peso seco)} / t$

Utilização aparente da proteína (UAP, %) =  $[\text{Peso corporal final (g)} \times \text{proteína corporal final (g.kg}^{-1})] - [\text{peso corporal inicial (g)} \times \text{proteína corporal inicial (g.kg}^{-1})] / \text{ingestão de proteína (peso seco, g)} \times 100$

Sobrevivência (%) =  $100 \times (\text{número final de peixes} / \text{número inicial de peixes})$

Pf e Pi representam o peso corporal final e inicial (g) dos peixes, respectivamente; T é o período experimental. Os dados foram em primeiro lugar avaliados para homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A transformação em arco-seno foi utilizada para os dados em porcentagem. Os parâmetros de crescimento, composição centesimal, atividade das enzimas digestivas, metabólitos sanguíneos foram submetidos à análise de variância ANOVA seguido do teste de Tukey para o contraste de médias ( $\alpha = 0,05$ ). A regressão segmentada foi aplicada ao ganho de peso para determinar exigência da relação CHO/L.

## Resultados

### Sobrevivência, crescimento e utilização das dietas

A variação da relação CHO/L não afetou a sobrevivência após os 32 dias experimentais, mas o desempenho de crescimento e a utilização das dietas foram influenciados significativamente (Tabela 5). Os maiores valores de peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico foram observados nos peixes alimentados com a relação CHO/L de 3, mas diminuíram continuamente com o aumento da relação. O consumo de ração e ingestão total de proteína seguiram essa tendência, com níveis mais elevados na relação CHO/L de 3. A eficiência alimentar e a utilização aparente da proteína não foram afetadas pela dieta.

Tabela 5. Desempenho de crescimento e utilização da ração de juvenis de sardinha-verdadeira alimentadas com dietas de diferentes taxas de CHO/L por 32 dias.

Item	CHO/L					
	2	3	4	5	6	7
S <sup>a</sup> (%)	97	97,66	98,33	98	98,33	98,33
PF <sup>b</sup> (g)	8,4±1,2 <sup>a</sup>	8,4±0,6 <sup>a</sup>	7,5±0,7 <sup>b</sup>	7,1 ± 0,8 <sup>bc</sup>	6,8 1,2 <sup>bc</sup>	6,6±1,3 <sup>c</sup>
GP <sup>c</sup> (%)	5,4±1,3 <sup>a</sup>	5,5±1,1 <sup>a</sup>	4,6±0,6 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,9 <sup>bc</sup>	3,8±0,8 <sup>bc</sup>	3,6±0,7 <sup>c</sup>
TCE <sup>d</sup> (%d <sup>-1</sup> )	3,3±0,6 <sup>a</sup>	3,3±0,5 <sup>a</sup>	2,9±0,3 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>bc</sup>	2,6±0,4 <sup>c</sup>	2,5±0,3 <sup>c</sup>
IT <sup>e</sup> (g)	9,0±0,1 <sup>ab</sup>	9,1±0,5 <sup>a</sup>	8,1±0,4 <sup>bc</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>cd</sup>	6,7±0,3 <sup>de</sup>	6,1±0,4 <sup>e</sup>
ITP <sup>f</sup> (g)	3,2±0,0 <sup>ab</sup>	3,4±0,2 <sup>a</sup>	2,9±0,2 <sup>bc</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>cd</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>de</sup>	2,2±0,2 <sup>e</sup>
EA <sup>g</sup>	60,1±3,4	55,8±1,4	56,1±3,5	54,6 ± 6,1	57,2±1,6	59,7±9,5
UAP <sup>h</sup>	26,2±2,2	24,6±2,1	25,0±0,9	26,2 ± 3,9	26,5±2,5	27,2±7,1

<sup>a</sup>S – sobrevivência; <sup>b</sup>PF- Peso final; <sup>c</sup>GP – ganho de peso; <sup>d</sup>TCE – Taxa de crescimento específico; <sup>e</sup>IT- Ingestão total(matéria seca); <sup>f</sup>ITP – Ingestão total de proteína (matéria seca); <sup>g</sup>EA- Eficiência alimentar; <sup>h</sup>UAP- Utilização de proteína aparente. Diferença significativa é denotada por diferentes letras (p<0.05). Dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Com base na análise de regressão segmentada do GP, o crescimento máximo foi obtido quando juvenis de sardinha-verdadeira

foram alimentados com a relação CHO/L de 3,41, o que corresponde a 30 e 8,8% de carboidratos e lipídios na dieta, respectivamente (Fig. 3).

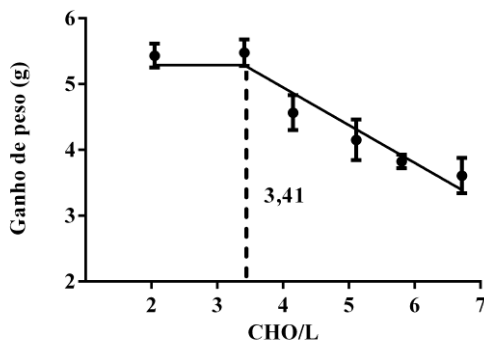


Figura 3. Regressão segmentada baseada no ganho de peso da sardinha-verdadeira alimentada com diferentes taxas de CHO/L por 32 dias. Os dados são mostrados como média e erro padrão.

### Composição centesimal

As cinzas e proteínas corporais não foram significativamente diferentes no período experimental (Tabela 6). O teor de lipídio diminuiu significativamente com o aumento da relação CHO/L. Em contraste, a umidade foi maior com o aumento de CHO/L.

Tabela 6. Composição centesimal dos juvenis de sardinha-verdadeira alimentados diferentes relações de CHO/L durante 32 dias.

CHO/L	Umidade(%)	Cinzas(%)	Lipídio(%)	Proteína(%)
Inicial	74,19±0,19	3,46±0,09	6,57±0,17	14,94±0,04
2	69,67±1,02 <sup>b</sup>	4,00±0,53	10,21±0,81 <sup>a</sup>	15,25±0,33
3	70,27±1,03 <sup>b</sup>	4,58±0,69	9,63±0,60 <sup>ab</sup>	15,17±0,91
4	71,10±0,37 <sup>ab</sup>	4,26±0,62	8,25±0,77 <sup>bc</sup>	15,38±0,53
5	71,85±1,34 <sup>ab</sup>	4,12±0,25	7,38±0,67 <sup>cd</sup>	15,75±0,46
6	72,87±0,36 <sup>a</sup>	4,23±0,19	6,27±0,22 <sup>d</sup>	15,95±0,64
7	72,75±0,73 <sup>a</sup>	4,10±0,27	6,11±0,30 <sup>d</sup>	15,59±1,21

Diferenças significativas na mesma coluna são denotadas por diferentes letras em expoente ( $p < 0.05$ ). Os dados iniciais não foram considerados na estatística. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.

## Metabólitos sanguíneos

Após 32 dias, os metabólitos sanguíneos de juvenis de sardinha-verdadeira não apresentaram diferença significativa com o aumento da relação de CHO/L (Tabela 7).

Tabela 7. Metabólitos sanguíneos da sardinha-verdadeira alimentadas com diferentes relações de CHO/L durante 32 dias.

CHO/L	PT (g L <sup>-1</sup> )	GL (mmol L <sup>-1</sup> )	CO (mmol L <sup>-1</sup> )	TG (mmol L <sup>-1</sup> )
2	53,2±7,70	4,00±0,84	2,17±0,87	1,84±0,30
3	55,7±19,7	4,46±1,35	1,91±0,49	1,96±0,29
4	61,8±24,2	4,38±0,53	1,45±0,51	1,88±0,56
5	60,2±27,6	4,08±0,62	1,70±0,52	2,30±0,41
6	41,9±11,2	3,97±0,53	1,75±0,48	1,90±0,41
7	47,2±28,9	4,21±0,59	1,83±0,60	1,80±0,28

PT: Proteínas Totais; GL: glicose; CO: colesterol; TG: triglicérides. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

## Enzimas digestivas

Ambas as atividades das proteases alcalina e ácida não apresentaram diferenças significativas entre as dietas (Fig. 4). No entanto, as atividades da amilase e lipase aumentaram significativamente nos peixes alimentados até a relação CHO/L de 4, diminuindo em níveis mais elevados.

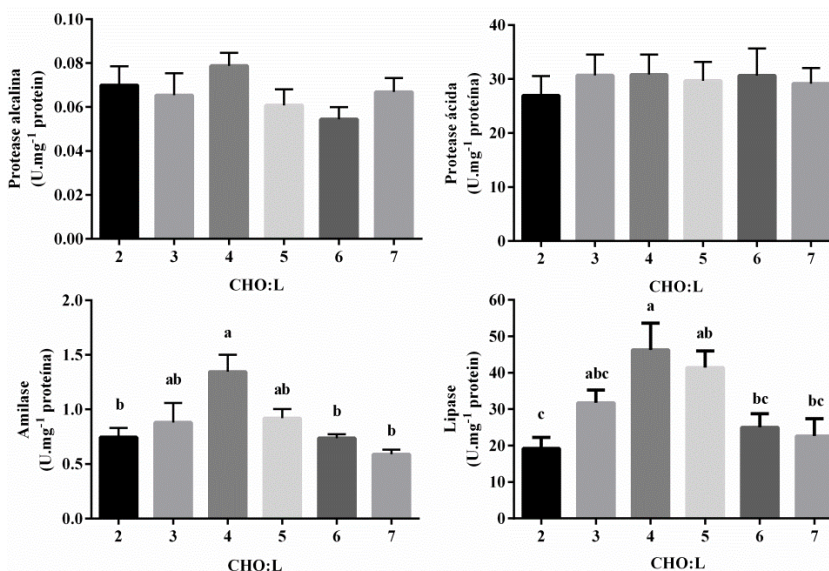


Figura 4. Atividade da protease ácida, alcalina, amilase, e lipase no trato gastrointestinal da sardinha-verdadeira alimentada com diferentes relações de CHO/L durante 32 dias. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Médias com letras iguais não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

Os carboidratos e os lipídios são importantes fontes de energia não proteica para os peixes que podem afetar o crescimento, saúde, reprodução e sobrevivência (Lall e Tibbetts, 2009), e são comumente incorporados nas dietas para maximizar a utilização da proteína para o crescimento (Li et al., 2012). No presente estudo, após 32 dias, a sobrevivência foi alta e semelhante entre os tratamentos, mostrando que os juvenis de sardinha-verdadeira toleram uma ampla gama de ambos os nutrientes.

Diferente dos carnívoros, os peixes onívoros são considerados capazes de usar altos níveis de carboidrato na dieta (Kamalam et al., 2016). A quantidade de carboidrato solúvel em dietas preparadas para espécies carnívoras é geralmente inferior a 20%, ao passo que dietas para espécies omnívoras pode conter entre 25 a 40% (Lall e Tibbetts, 2009). No presente estudo, a relação CHO/L de 3,41, que corresponde a 30% de carboidrato, promoveu a maior ingestão de dieta e de proteína, além do maior crescimento da sardinha-verdadeira. No entanto, além



dessa relação os parâmetros de crescimento diminuíram. Alguns trabalhos mostraram que a inclusão excessiva de amido na dieta pode diminuir o consumo de alimentos nos peixes, impedindo a ingestão de nutrientes essenciais ao crescimento (Zamora-Sillero et al., 2013). Além disso, um estudo recente mostra evidências moleculares de como os carboidratos da dieta podem regular a ingestão de alimentos nos peixes (Polakof et al., 2012). Com base em nossos resultados, podemos supor que a alta inclusão de carboidratos na dieta, de até 30%, inibiu significativamente o consumo da sardinha-verdadeira e consequentemente afetou o crescimento.

O desequilíbrio da relação CHO/L na dieta frequentemente afeta o desempenho do crescimento e composição centesimal nos peixes (Borba et al., 2006). Valores altos tendem a evitar a deposição de lipídios em muitas espécies (Ali et al, 2012; Gao et al, 2010; Hu et al, 2007; Moro et al, 2010). Uma grande reserva lipídica oferece vantagens e desvantagens para o animal. A gordura possui alta densidade de energia, proporcionando a redução de peso, mas em excesso pode restringir a locomoção dos animais (Sheridan, 1994). A baixa quantidade de lipídio corporal encontrada na sardinha-verdadeira quando alimentada com dieta rica em carboidratos é possivelmente consequência do menor consumo que não permitiu o armazenamento nas reservas corporais. Apoiando essa ideia, um estudo anterior sobre sardinha-verdadeira mostrou que a diminuição da taxa de alimentação provoca menor deposição de lipídios no organismo (Baloi et al., no prelo). Outro resultado recorrente, como encontrado no presente estudo, é a diminuição da umidade à medida que há o aumento de lipídios no corpo. Provavelmente, isto é devido ao carácter hidrofóbico do armazenamento de gordura (Sheridan, 1994).

Tem sido demonstrado que carboidratos e lipídios da dieta podem afetar a digestão e os metabólitos do sangue (Castro et al., 2016). No entanto, nosso trabalho não apresentou diferença significativa nos metabólitos plasmáticos dos juvenis de sardinha brasileira. Mudanças pós-prandiais de triacilglicerolemia, colesterolemia e glicemia promovidas pela dieta rica em carboidratos e lipídios ocorrem frequentemente em outras espécies (Castro et al., 2016; Hu et al., 2007; Kamalam et al., 2016), e indicam o estado metabólico e fisiológico do organismo (Zhou et al., 2016).

Diferentemente dos omnívoros, os peixes carnívoros são geralmente intolerantes às dietas ricas em carboidrato, apresentando uma hiperglicemia pós-prandial persistente, embora a intensidade do pico e retorno da taxa de glicose no sangue sejam espécie específica e

dependam da complexidade, nível de inclusão na dieta e da fonte de carboidratos (Kamalam et al., 2016 ). Enquanto o lipídio no sangue pode surgir a partir de lipídios da dieta e de mobilização endógena (Sheridan, 1994), a proteína do plasma sanguíneo pode ser afetada pelos nutrientes ingeridos e o aumento está associado a uma resposta imune inata mais forte nos peixes (Li et al., 2012 ). No presente estudo , depois de 18 horas de alimentação, a homeostase dos metabólitos da sardinha-verdadeira foi estabelecida independentemente da dieta experimental, indicando ser uma espécie tolerante a uma ampla variação de lipídios e carboidratos na dieta. A indiferença nos parâmetros sanguíneos de proteína, colesterol e triglicérides também foram encontrados no sargo *Sparidentex hasta*, (Mozanzadeh et al., 2016), corvina japonesa *Larmichthys crocea* (Zhou et al., 2016) e na corvina *Argyrosomus regius* (Chatzifotis et al., 2010) alimentados com diferentes taxas de CHO/L.

A digestibilidade dos nutrientes depende de muitas razões, que inclui a atividade das enzimas digestivas (Honorato et al., 2015). As enzimas digestivas desempenham um papel importante na quebra dos nutrientes ingeridos permitindo que eles sejam absorvidos e utilizados. Em algumas espécies, as proteases alcalinas e ácidas, amilase e lipase respondem positivamente ao nível de nutrientes ingeridos (Buddington e Krogdahl, 2004). No presente estudo, as dietas experimentais testadas eram isoprotéicas e isoenergéticas e, como esperado, as atividades das proteases alcalinas e ácidas da sardinha-verdadeira foram semelhantes.

No entanto, a fonte de energia não proteica da dieta foi variável, bem como a resposta de amilase e lipase. Responsável pela hidrólise dos carboidratos e lipídios, respectivamente, as atividades de amilase e lipase aumentaram até a relação CHO/ L de quatro, diminuindo após esse nível. É sabido que a ação da amilase intestinal é um passo importante para a utilização de carboidratos na dieta (Kamalam et al., 2016), estando a sua atividade diretamente relacionada com a inclusão de carboidratos, embora a capacidade de adaptação possa ser restrita às espécies onívoras e herbívoras (Krogdahl et al., 2005; Wang et al., 2016).

No que diz respeito à utilização de lipídios, a lipase dependente de sais biliares é considerada a principal enzima digestiva responsável pela hidrólise de lipídios na dieta (Sæle et al., 2010) e responde de forma positiva para a inclusão deste nutriente na dieta (Mohanta et al, 2008; Zhou et al, 2015, 2016). Assim como observado no presente estudo, a atividade das enzimas digestivas frequentemente está associada à capacidade digestiva, à utilização de nutrientes e ao desenvolvimento dos peixes (Lundstedt et al., 2004).

Em conclusão, com base nas atividades das enzimas digestivas, parâmetros sanguíneos e sobrevivência, a sardinha-verdadeira parece tolerar um alto teor de carboidratos e a de lipídios na dieta, assim como outras espécies marinhas onívoras. No entanto, se o objetivo for produzir isca-viva com uma dieta com melhor de custo-benefício, a relação CHO/L de 3,41, o que corresponde a 30 e 8,8% de carboidratos e de lipídios, respectivamente, sendo economicamente recomendado, pois promove o maior crescimento.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro a este projeto e para a bolsa de doutorado para o primeiro autor (AUX-PE 879/2010 Ciências do Mar). Também gostaríamos de agradecer aos laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina (LAPMAR, LABCAI, LABNUTRI e Laboratório de Enzimologia Aplicada) pelo apoio técnico e Hilton Hiroshi Oshima (Cargill Nutrição Animal) por fornecer o premix de minerais e vitaminas.

## **Referências**

- Aguilar-Quaresma, J., Sugai, J.K., 2005. Circadian profile of feed consumption and amylase and maltase activities in the juvenile shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. J. World Aquac. Soc. 36, 141–147. doi:10.1111/j.1749-7345.2005.tb00141.x
- Ali, M.Z., Zaher, M., Alam, M.J., Hussain, M.G., 2012. Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, feed conversion, protein utilisation and body composition in climbing perch, *Anabas testudineus*. Int. J. Fish. Aquac. 4, 1–6. doi:10.5897/IJFA11.005
- Andrade, H.A., Teixeira Santos, J.A., 2004. Seasonal trends in the recruitment of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) to the fishing ground in the southwest Atlantic. Fish. Res. 66, 185–194. doi:10.1016/S0165-7836(03)00199-1
- Anson, B.Y.M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 79–89. doi:10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC, 1999. Official Methods of Analysis of AOAC International. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. Method ce 2-66.

doi:10.3109/15563657608988149

Bakun, A., Parrish, R.H., 1990. Comparative studies of coastal pelagic fish reproductive habitats: the Brazilian sardine (*Sardinella Aurita*). ICES J. Mar. Sci. 46, 269–283. doi:10.1093/icesjms/46.3.269

Baloi, M., de Carvalho, C.V.A., Sterzelecki, F.C., Passini, G., Cerqueira, V.R., 2014. Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). Aquac. Res. 47, 554–560. doi:10.1111/are.12514

Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E., 2006. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. Aquac. Nutr. 12, 183–191. doi:10.1111/j.1365-2095.2006.00401.x

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Buddington, R.K., Kroghdahl, Å., 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 139, 261–271. doi:10.1016/j.cbpb.2004.09.007

Carvalho, C.V.A., Bianchini, A., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., 2010. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). Aquac. Res. 41, 511–518. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02340.x

Castro, C., Corraze, G., Basto, A., Larroquet, L., Panserat, S., Oliva-Teles, A., 2016. Dietary Lipid and Carbohydrate Interactions: Implications on Lipid and Glucose Absorption, Transport in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Juveniles. Lipids. doi:10.1007/s11745-016-4140-2

Cergole, M.C., Dias-Neto, J., 2011. Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil, Ibama.

Cergole, M.C., Saccardo, S.A., Rossi-wongtschowski, C.L.D.B., 2002. Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997. Rev. Bras. Oceanogr. 50, 13–26. doi:10.1590/S1679-87592002000100002

Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M.,

- Nengas, I., Mylonas, C.C., 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307, 65–70. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.07.002
- Collette, B.B., Nauen, C.E., 1983. Scombrids of the world, in: *FAO Species Catalogue*. Rome, pp. 40–48.
- Coutinho, F., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Magalhães, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2016. Dietary protein requirement of zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe 1838) juveniles. *Aquac. Nutr.* 22, 465–471. doi:10.1111/anu.12269
- Cowey, C.B., Sargent, J.R., 1977. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 57, 269–273. doi:10.1016/0305-0491(77)90051-7
- Dallagnolo, R., Schwingel, P.R., Perez, J.A.A., 2010. Estimativas de produção anual de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em Santa Catarina: um modelo de projeção de capturas a partir dos padrões mensais de desembarque no Estado. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 14, 95–104.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. doi:10.1152/physrev.00050.2003
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture.
- Ganias, K., 2014. *Biology and Ecology of Sardines and Anchovies*. CRC Press 375. doi:10.1111/jfb.12787
- Gao, W., Liu, Y.J., Tian, L.X., Mai, K.S., Liang, G.Y., Yang, H.J., Huai, M.Y., Luo, W.J., 2010. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquac. Nutr.* 16, 327–333. doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x
- García-Carreño, F.L., Toro, A.N. del, Ezquerro, M., 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I: Effect of protease inhibitors in protein ingredients. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 36–40.
- Ghanawi, J., Roy, L., Davis, D.A., Saoud, I.P., 2011. Effects of dietary lipid levels on growth performance of marbled spinefoot rabbitfish

*Siganus rivulatus*. *Aquaculture* 310, 395–400. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.012

Gigliotti, E.S., Gherardi, D.F.M., Paes, E.T., Souza, R.B., Katsuragawa, M., 2010. Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. *J. Fish Biol.* doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02802.x

Honorato, C.A., de Almeida, L.C., Camilo, R.Y., Moraes, G., Nunes, C.D.S., Carneiro, D.J., 2015. Dietary carbohydrate and food processing affect the digestive physiology of *Piaractus mesopotamicus*. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/anu.12308

Hu, Y.H., Liu, Y.J., Tian, L.X., Yang, H.J., Liang, G.Y., Gao, W., 2007. Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). *Aquac. Nutr.* 13, 291–297. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00476.x

Kamalam, B.S., Medale, F., Panserat, S., 2016. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.02.007

Krogdahl, Å., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x

Kurtz, F.W., Matsuura, Y., 2001. Food and feeding ecology of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) larvae from the southeastern Brazilian Bight. *Rev. bras. Ocean.* 49, 61–74. doi:10.1590/S1679-87592001000100006

Lall, S.P., Tibbetts, S.M., 2009. Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 12, 361–372. doi:10.1016/j.cvex.2009.01.005

Li, X.F., Liu, W. Bin, Lu, K. Le, Xu, W.N., Wang, Y., 2012. Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 316–323. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.007

Lin, Y.H., Shiau, S.Y., 2003. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune responses. *Aquaculture* 225, 243–250. doi:10.1016/S0044-8486(03)00293-X

- Lundstedt, L.M., Melo, J.F.B., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 137, 331–339. doi:10.1016/j.cbpc.2003.12.003
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J.K., Sahu, N.P., 2008. Optimal dietary lipid level of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings in relation to growth, nutrient retention and digestibility, muscle nucleic acid content and digestive enzyme activity. *Aquac. Nutr.* 14, 350–359. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00542.x
- Moro, G.V., Camilo, R.Y., Moraes, G., Fracalossi, D.M., 2010. Dietary non-protein energy sources: Growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. *Aquac. Res.* 41, 394–400. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02352.x
- MPA, 2012. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - 2010. *Bol. Estatístico da Pesca e Aquicultura* 129. doi:10.1007/s12032-011-9855-6
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15103–10. doi:10.1073/pnas.0905235106
- NRC, 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*, National Academies Press. doi:10.17226/13039
- Occhialini, D.S., 2013. Diagnóstico da pesca de isca-viva empregada pela frota atuneira no Sudeste e Sul do Brasil. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 1999. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, 325–334. doi:10.1016/S0044-8486(99)00168-4
- Perin, S., Vaz-dos-Santos, A.M., 2014. Morphometry and relative growth of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) in the Southeastern Brazilian bight. *Arq. Zool.* 45, 63–72.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose

metabolism in fish: A review. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. doi:10.1007/s00360-012-0658-7

Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hamre, K., 2010. Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 157, 252–259. doi:10.1016/j.cbpa.2010.07.003

Schneider, F., Schwingel, P.R., 1999. A preliminary study on the trofic ecology of *Sardinella brasiliensis* of southern Brazil 3, 67–72.

Senina, I., Sibert, J., Lehodey, P., 2008. Parameter estimation for basin-scale ecosystem-linked population models of large pelagic predators: Application to skipjack tuna. Prog. Oceanogr. 78, 319–335. doi:10.1016/j.pocean.2008.06.003

Sheridan, M.A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem. 107, 495–508. doi:10.1016/0305-0491(94)90176-7

Torfi Mozanzadeh, M., Yavari, V., Marammazi, J.G., Agh, N., Gisbert, E., 2016. Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy ( *Sparidentex hasta* ) juveniles. Aquac. Nutr. 1, n/a-n/a. doi:10.1111/anu.12415

Vega-Orellana, O.M., Fracalossi, D.M., Sugai, J.K., 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. Aquaculture 252, 484–493. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.002

Wang, J., Li, X., Han, T., Yang, Y., Jiang, Y., Yang, M., Xu, Y., Harpaz, S., 2016. Effects of different dietary carbohydrate levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile grouper *Epinephelus akaara*. Aquaculture 459, 143–147. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.034

Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic fish feeds. J Fish Sci 68 SRC-G, 242–252.

Zamora-Sillero, J., Ramos, L.R. V, Romano, L.A., Monserrat, J.M., Tesser, M.B., 2013. Effect of dietary dextrin levels on the growth performance, blood chemistry, body composition, hepatic triglicerides and glycogen of lebranche mullet juveniles (*mugil liza valenciennes* 1836, *mugilidae*). J. Appl. Ichthyol. 29, 1342–1347. doi:10.1111/jai.12255



Zhou, C., Ge, X., Niu, J., Lin, H., Huang, Z., Tan, X., 2015. Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture* 437, 390–397. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.016

Zhou, P., Wang, M., Xie, F., Deng, D.F., Zhou, Q., 2016. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture* 452, 45–51. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.010



## CONCLUSÕES GERAIS

- a) A sardinha-verdadeira possui uma ampla tolerância para o teor de proteína na dieta, de 250 a 500 g.kg<sup>-1</sup> evidenciada pela sobrevivência acima de 98% e composição centesimal inalterada;
- b) A sardinha-verdadeira tem predisposição para utilização de proteína como forma de energia, visto que a retenção proteica foi indiretamente proporcional à ingestão de proteína;
- c) A concentração de 367,7 g.kg<sup>-1</sup> de proteína na dieta foi estimada como a quantidade ideal para o crescimento da sardinha-verdadeira;
- d) Dietas ricas em carboidrato e lipídios são toleradas pela sardinha-verdadeira, tendo em vista a alta taxa de sobrevivência observada nessas condições;
- e) A relação de CHO/L de 3,41 foi estimada como a ideal para o crescimento da sardinha-verdadeira, o que corresponde a 300 e 88 g.kg<sup>-1</sup> de carboidrato e lipídio, respectivamente;
- f) A atividade da protease alcalina, lipase e amilase da sardinha-verdadeira podem ser usadas como ferramentas para auxiliar a formulação da dieta.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho foi o primeiro a verificar as exigências nutricionais da sardinha-verdadeira, determinando a quantidade necessária de proteína, carboidrato e lipídio na dieta. Contudo, mais estudos são necessários para melhorar a utilização dos nutrientes e diminuir os custos de produção.

As dietas aqui utilizadas foram formuladas com ingredientes semipurificados e que apresentam grande taxa de digestibilidade nos peixes. Contudo, não são as matérias-primas comumente utilizadas pela indústria aquícola, e, portanto, a realização de estudos sobre a digestibilidade e utilização de ingredientes práticos de baixo custo pela sardinha-verdadeira são necessários.

Muitos outros nutrientes não foram determinados no presente trabalho, e que são extremamente importantes na criação de peixes marinhos, como os ácidos graxos, as vitaminas e minerais. Portanto, existe ainda um longo caminho a ser percorrido no campo da nutrição para ser estudado nas diferentes fases da sardinha-verdadeira.

Contudo, os próximos estudos devem focar o principal problema para o início da produção de isca-viva em larga escala, a nutrição e alimentação durante a fase larval. Durante essa fase, são utilizados insumos importados e de alto custo, desestimulando economicamente a criação em cativeiro. Assim, o desenvolvimento de um protocolo alimentar alternativo barato nessa fase se faz necessário para iniciar a produção massal de sardinha-verdadeira.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALI, A.; AL-ASGAH, N. A. Effect of feeding different carbohydrate to lipid ratios on the growth performance and body composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Animal Research*, v. 50, p. 91–100, 2001.

ALI, M. Z. *et al.* Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, feed conversion, protein utilisation and body composition in climbing perch, *Anabas testudineus*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2012. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/ijfa/abstracts/abstracts/abstracts2012/Jan/9Jan/Ali et al.htm](http://www.academicjournals.org/ijfa/abstracts/abstracts/abstracts2012/Jan/9Jan/Ali%20et%20al.htm)>.

ALMEIDA, L. R.; ANDRADE, H. A. Comparação entre a eficiência de captura das frotas de vara e isca-viva e de cerco na pescaria do bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*): análise preliminar. *Notas Técnicas Da Facimar*, v. 6, p. 59–64, 2002.

BAKKE, A. M.; GLOVER, C.; KROGDAHL, Å. 2 – Feeding, digestion and absorption of nutrients. *Fish Physiology*. [S.l: s.n.], 2010. v. 30. p. 57–110.

BAKUN, A.; PARRISH, R. H. Comparative studies of coastal pelagic fish reproductive habitats: the Brazilian sardine (*Sardinella Aurita*). *ICES Journal of Marine Science*, v. 46, n. 3, p. 269–283, 1990.

BALOI, M. *et al.* Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). *Aquaculture Research*, v. 47, n. 2, p. 554–560, 2014.

BOOTH, M. A.; MOSES, M. D.; ALLAN, G. L. Utilisation of carbohydrate by yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture*, v. 376, p. 151–161, 2013.

BRAGA, F. M. DE S. Estudo da diversidade de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879), na área entre Macaé (22°23'S) e Ilha de Santa Catarina (27°35'S) I. Crescimento de dimensões corporais. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 4, n. 3, p. 235–250, 1987.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDAHL, Å. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 139, n. 3, p. 261–271, 2004.

CARVALHO, C. V. A. *et al.* The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research*, v. 41, n. 4, p. 511–518, 2010.

CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O futuro da Pesca da Aquicultura Marinha no Brasil: a Maricultura. *Ciência e Cultura*, v. 62, n. 3, p. 38–39, 2010.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. *Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil*. [S.l.: s.n.], 2011.

CERGOLE, M. C.; SACCARDO, S. A.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997. *Revista Brasileira De Oceanografia*, v. 50, n. 848, p. 13–26, 2002.

DALLAGNOLO, R.; SCHWINGEL, P. R.; PEREZ, J. A. A. Estimativas de produção anual de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em Santa Catarina: um modelo de projeção de capturas a partir dos padrões mensais de desembarque no Estado. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 14, n. 2, p. 95–104, 2010.

DEBNATH, D. *et al.* Digestive enzymes and metabolic profile of Labeo rohita fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, v. 146, n. 1, p. 107–114, 2007.

DENG, J. *et al.* Dietary protein requirement of juvenile Asian red-tailed catfish *Hemibagrus wyckioides*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 170, n. 3–4, p. 231–238, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2011.08.014>>.

EL HAMMADY, A. K. . effect of dietary carbohydrate to lipid ratio on growth performance of hybrid tilapia ( *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries.*, v. 6, n. 3, p. 17–38, 2002.

EL-DAKAR, A. Y.; SHALABY, S. M.; SAOUD, I. P. Dietary protein requirement of juvenile marbled spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquaculture Research*, v. 42, n. 7, p. 1050–1055, 2011.

ELLIS, S. C.; REIGH, R. C. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, v. 97, n. 4, p. 383–394, 1991.



EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005. Disponível em:

<<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00050.2003>>.

FAO. *The state of world fisheries and aquaculture*. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>.

FIGUEIREDO, J. L.; SALLES, A. C. R.; RABELO, L. B. *Sardinella Brasiliensis* (Steindachner, 1879) (Teleostei: Clupeidae), Nome Válido Aplicado À Sardinha-Verdadeira No Sudeste Do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 50, n. 18, p. 281–283, 2010.

GANIAS, K. *Biology and Ecology of Sardines and Anchovies*. CRC Press, p. 375, 2014.

GAO, W. *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, v. 16, n. 3, p. 327–333, 2010.

GARCIA, V.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Distribution of Eggs and Larvae of Brazilian Sardine in the Coastal Region of Santa Catarina State, Brazil. v. 41, n. 3, p. 619–631, 2015.

GARCÍA-MEILÁN, I. *et al.* Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects on digestive and absorptive processes. *Aquaculture*, v. 412–413, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.031>>.

GARLING JR, D. L.; WILSON, R. P. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerling channel catfish. *The Progressive Fish-Culturist*, v. 39, n. 1, p. 43–47, 1977.

GIGLIOTTI, E. S. *et al.* Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. *Journal of Fish Biology*, 2010.

GLENCROSS, B. *et al.* An analysis of the effects of different dietary macronutrient energy sources on the growth and energy partitioning by juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, reveal a preference for protein-derived energy. *Aquaculture Nutrition*, v. 20, n. 6, p. 583–594, 2014.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of

digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, v. 170, n. 3–4, p. 267–283, 1999.

HOFER, R.; SCHIEMER, F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, v. 48, n. 3, p. 342–345, 1981.

HONORATO, C. A. *et al.* Dietary carbohydrate and food processing affect the digestive physiology of *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture Nutrition*, 2015.

JABLONSKI, S. The Brazilian sardine. Is there any room for modelling? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 2, n. 2, p. 86–93, 2007.

KAMALAM, B. S.; MEDALE, F.; PANSEERAT, S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>>.

KARASOV, H. W.; DOUGLAS, A. E. Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*, 2013.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015, v. 173, n. 1, p. 111–133, 1 out. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>>.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, v. 200, n. 1–2, p. 181–201, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848601007001>>.

KROGDAHL, Å.; HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P. *Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages*. *Aquaculture Nutrition*. [S.l.: s.n.], 2005

KUMAR, S. *et al.* Short-term exposure to higher temperature triggers the metabolic enzyme activities and growth of fish *Labeo rohita* fed with high-protein diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 19, n. 2, p. 186–198, 2013.

KURTZ, F. W.; MATSUURA, Y. Food and feeding ecology of the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) larvae from the southeastern Brazilian Bight. *Rev. bras. oceanogr.*, v. 49, p. 61–74, 2001.

LALL, S. P.; TIBBETTS, S. M. Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, v. 12, n. 2, p. 361–372, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.005>>.

LEE, S.; PARK, C. S.; BANG, I. C. Dietary protein requirement of young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed isocaloric diets. *Fisheries science*, v. 68, n. 1, p. 158–164, 2002.

LI, X. F. *et al.* Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 33, n. 2, p. 316–323, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.007>>.

LIN, S.; LUO, L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 168, n. 1, p. 80–87, 2011.

LOVELL, R. T. *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, D.C.: National Academies Press, 1993. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/2115>>.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 137, n. 3, p. 331–339, 2004.

LUO, Z. *et al.* Optimal dietary protein requirement of grouper *Epinephelus coioides* juveniles fed isoenergetic diets in floating net cages. *Aquaculture Nutrition*, v. 10, n. 4, p. 247–252, 2004.

MATSUURA, Y. Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) spawning in the southeast Brazilian Bight over the period 1976-1993. *Rev. bras. oceanogr.*, v. 46, n. 1, p. 33–43, 1998.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture*, v. 240, n. 1–4, p. 331–343, 2004.

MOHSENI, M. *et al.* The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso*. *Journal of Applied*

*Ichthyology*, v. 27, n. 2, p. 775–780, 2011.

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - 2010. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*, p. 129, 2012. Disponível em: <[http://dialnet.unirioja.es/servlet/fichero\\_articulo?codigo=1448558&orden=68201](http://dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=1448558&orden=68201)>.

NAYLOR, R. L. *et al.* Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 36, p. 15103–10, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349338795&partnerID=tZOtx3y1>>.

NEMATIPOUR, G. R.; SERRANO, J. A.; GATLIN III, D. M. Dietary protein requirement of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) and relative use of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, v. 101, p. 283–291, 1992.

NRC. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. [S.l: s.n.], 2011.

OCCHIALINI, D. S. *Diagnóstico da pesca de isca-viva empregada pela frota atuneira no Sudeste e Sul do Brasil*. 2013. 171 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013. Disponível em: <[file:///C:/Users/user/Downloads/323300 \(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/323300%20(1).pdf)>.

PEREIRA, H. DE L. *Manejo e maturação em cativeiro da sardinha verdadeira, Sardinella Brasilliensis (Esteindachner, 1879), no sul do brasil*. 2010. 82 f. Universidade federal de Santa Catarina, 2010.

PERIN, S.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M. Morphometry and relative growth of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) in the Southeastern Brazilian bight. *Arquivos de Zoologia*, v. 45, n. esp, p. 63–72, 2014.

POLAKOF, S. *et al.* Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. [S.l: s.n.], 2012

RAY, A. K.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, v. 18, n. 5, p. 465–492, 2012.

REIS DA SILVA, L. A. Crescimento de Juvenis, Maturação Sexual, Reprodução e Larvicultura da Sardinha-Verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) em Cativeiro. p. 43, 2013.

ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. DEL B. *et al.* Larval condition and growth of *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879): preliminary results from laboratory studies. *Scientia Marina*, v. 67, n. 1, p. 13–23, 2003.

SANTOS, R. C. DOS; RODRIGUES-RIBEIRO, M. Demanda de iscas vivas para a frota atuneira Catarinense na safra de 1998/99: cpue, composição e distribuição das capturas. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 4, p. 97–101, 2000.

SCHWARTZLOSEI, R. A. WORLDWIDE LARGE-SCALE FLUCTUATIONS OF SARDINE AND ANCHOVY POPULATIONS. *Afr. J. mar. Sci.*, v. 21, p. 289–347, 1999.

SINGH, R. K.; BALANGE, A. K.; GHUGHUSKAR, M. M. Protein sparing effect of carbohydrates in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. *Aquaculture*, v. 258, n. 1–4, p. 680–684, 2006.

SMICHI, N. *et al.* Purification and biochemical characterization of an acid-stable lipase from the pyloric caeca of sardine (*Sardinella aurita*). *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 162, n. 5, p. 1483–1496, 2010.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO-JÚNIOR, J. M. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes eo uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. *Ensaio e Ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde*, v. XIII, n. 2, p. 79–93, 2009. Disponível em: <<http://www.sare.anhanguera.com/index.php/renc/article/viewArticle/964>>.

TAKEUCHI, R. S. *Utilização de benzocaína, eugenol e triclaína metanosulfato (MS-222) como anestésicos em juvenis e adultos para a sardinha verdadeira, Sardinella brasiliensis (STEINDACHNER, 1879) Dissertação*. 2012. 36 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

TAN, Q. *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and feed utilization in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 23, n. 5, p. 605–610, 2007.

TENGJAROENKUL, B. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, v. 182, n. 3–4, p. 317–327, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848699002707>>.

THONGPRAJUKAEW, K. *et al.* Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*, v. 322–323, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.006>>.

WATANABE, T. LIPID NUTRITION IN FISH. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v. 73, n. 1, p. 3–15, 1982.

XIONG, D. M. *et al.* Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 1, p. 56–64, 2011.

YANG, S. D. *et al.* Influence of dietary protein levels on growth performance, carcass composition and liver lipid classes of juvenile *Spinibarbus hollandi* (Oshima). *Aquaculture Research*, v. 34, n. 8, p. 661–666, 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://000184131500010>.

YONEDA, N. T. Criação em laboratório de larvas da sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* e estudo dos incrementos diários nos otólitos. *Criação em laboratório de larvas da “Sardinha-verdadeira”, *Sardinella brasiliensis* e estudo dos incrementos diários nos otólitos*, 1987.

ZAMBONINO INFANTE, J. L.; CAHU, C. L. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, v. 268, n. 1–4 SPEC. ISS., p. 98–105, 2007.

ZAMORA-SILLERO, J. *et al.* Effect of dietary dextrin levels on the growth performance, blood chemistry, body composition, hepatic triglicerides and glycogen of lebranche mullet juveniles (*mugil liza valenciennes* 1836, mugilidae). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 29, n. 6, p. 1342–1347, 2013.

## APÊNDICE

### Apêndice I – Indução de adulto selvagem de sardinha-verdadeira com hormônio LHRHa



### Apêndice II – Estrutura dos tanques experimentais



### **Apêndice III - Sistema de recirculação (filtro de areia, luz UV e skimmer)**



### **Apêndice IV – Sardinha-verdadeira experimental**

